

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

Funktionsanalyse varianter Proteine durch häufige humane Mutationen des
Phenylalaninhydroxylase-Gens

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Christine Anne Farnik

aus
Bremen
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ania Muntau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Vogeser und Prof. Dr. Elke Holinski-Feder

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Michael Staudigl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

Eidesstattliche Versicherung

Farnik, Christine

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Funktionsanalyse varianter Proteine durch häufige humane Mutationen des
Phenylalaninhydroxylase-Gens

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bremen, 18.06.2018 Farnik, Christine

Für meine Schwester.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **VI**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS **VIII**

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | <u>EINLEITUNG</u> | 1 |
| 1.1 | Phenylketonurie: Historischer Hintergrund | 1 |
| 1.2 | Die Phenylketonurie | 3 |
| 1.3 | Klinisches Bild der Phenylketonurie | 8 |
| 1.3.1 | Biochemie des Phenylalanin-Stoffwechsels | 9 |
| 1.3.2 | Regulation und Struktur der Phenylalaninhydroxylase | 11 |
| 1.3.3 | Molekularer Mechanismus des Funktionsverlustes der PAH | 13 |
| 1.4 | Therapie der Phenylketonurie | 14 |
| 1.4.1 | Diätische Behandlung | 15 |
| 1.4.2 | Tetrahydrobiopterin als pharmakologische Therapie | 15 |
| 1.4.3 | Zukünftige Therapieformen der PKU | 16 |
| 2 | <u>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</u> | 18 |
| 3 | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | 19 |
| 3.1 | Material | 19 |
| 3.1.1 | Antibiotika | 19 |
| 3.1.2 | Antikörper | 19 |
| 3.1.3 | Chemikalien und Substanzen | 19 |
| 3.1.4 | Enzyme | 20 |
| 3.1.5 | Größenstandards | 21 |
| 3.1.6 | Bakterienstämme | 21 |
| 3.1.7 | Eukaryote Zelllinien | 21 |
| 3.1.8 | Vektoren | 22 |
| 3.1.9 | Puffer und Medien | 22 |
| 3.1.10 | Geräte | 23 |
| 3.1.11 | Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 3.1.12 | Software | 25 |
| 3.2 | Methoden | 26 |
| 3.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 26 |
| 3.2.1.1 | Gezielte Mutagenese (<i>Site-Directed-Mutagenesis</i> , SDM) | 26 |
| 3.2.1.2 | Ligation mit der LR-Rekombinationsreaktion (Gateway®-Technologie) | 28 |
| 3.2.1.3 | Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen | 30 |
| 3.2.1.4 | Bestimmung der DNS-Konzentration | 30 |
| 3.2.1.5 | DNS-Restriktion mit Endonukleasen | 31 |
| 3.2.1.6 | Agarosegelelektrophorese | 32 |
| 3.2.2 | Mikrobiologische Methoden | 32 |
| 3.2.2.1 | Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen | 32 |
| 3.2.2.2 | Anzucht transformierter <i>E.coli</i> -Zellen auf Agarplatten und in flüssigem Medium | 33 |
| 3.2.2.3 | Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen | 33 |
| 3.2.2.4 | Herstellung von Glycerinkulturen | 33 |

| | | |
|----------|-----------------------------|-----------|
| <u>7</u> | <u>DANKSAGUNG</u> | <u>92</u> |
| <u>8</u> | <u>LITERATURVERZEICHNIS</u> | <u>93</u> |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|---|
| ADHS | Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung |
| Aqua bidest. | Aqua bidestilliert |
| Bp | Basenpaar/e |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> (dt.: Rinderserumalbumin) |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| camp | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| cDNS | <i>Copy</i> oder <i>complimentary</i> DNS |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| dH ₂ O | Destilliertes Wasser |
| DHPR | Dihydropterinreduktase |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DpnI | <i>Diplococcus pneumoniae</i> |
| dt. | deutsch |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | <i>Enhanced Chemoluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| engl. | englisch |
| FDA | <i>US Food and Drug Administration</i> |
| Ggf. | Gegebenenfalls |
| h | <i>Hours</i> (dt.: Stunden) |
| HEPES | Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| kb | Kilo Basen |
| kDa | Kilo Dalton |
| LB-Medium | <i>Luria broth</i> bzw. Luria-Bertani-Medium |
| LDS | Lithiumdodecylsulfat |
| MBP | Maltose-bindendes Protein |
| min | Minuten |
| MOPS-Puffer | 4-Morpholinpropansulfonsäure-Puffer |
| NaCl | Natrium Chlorid |

| | |
|------------|--|
| Nm | Nanometer |
| OD | Optische Dichte |
| OMIM | <i>Online Mendelian inheritance in Man</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Page | Polyacrylamidgelelektrophorse |
| PAH | Phenylalaninhydroxylase |
| PBS-Puffer | <i>Phosphate buffered saline</i> (dt.: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | <i>Polymerase-chain-reaction</i> (dt.: Polymerasekettenreaktion) |
| Phe | Phenylalanin |
| PKU | Phenylketonurie |
| rpm | <i>Rounds per minute</i> (dt.:Runden pro Minute) |
| SDS | <i>Sodiumdodecylsulfate</i> (dt.: Natriumdodecylsulfat) |
| Sec | <i>Seconds deutsch:</i> Sekunden |
| Ser | Serin |
| TMS | Tandem-Massenspektrometrie |
| TBE-Puffer | Tris/Borsäure/EDTA -Puffer |
| TBS-Tween | <i>Tris buffered saline</i> (dt.: Tris gepufferte Kochsalzlösung) |
| TrpH | Tryptophanhydroxylase |
| Tyr | Tyrosin |
| TyrH | Tyrosinhydroxylase |
| UV | Ultraviolett |
| WT | Wildtyp |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | Seite |
|---|-------|
| Abbildung 1: Reaktion der Phenylalaninhydroxylase | 10 |
| Abbildung 2: Regeneration von Tetrahydrobiopterin | 10 |
| Abbildung 3: Tyrosin als Ausgangssubstanz für Dopamin, Melanin und Katecholamine | 11 |
| Abbildung 4: Struktur der Phenylalaninhydroxylase | 12 |
| Abbildung 5: Größenstandards | 21 |
| Abbildung 6: LR-Reaktion | 29 |
| Abbildung 7: Theoretische Darstellung eines Größenausschlusschromatogramms | 37 |
| Abbildung 8: Produktkontrolle | 48 |
| Abbildung 9: Expressionstests rekombinanter WT-PAH und varianter PAH | 50 |
| Abbildung 10: Gesamtproteingehalt von Wildtyp und varianter PAH nach Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten und bei unterschiedlichen Postinduktionstemperaturen | 51 |
| Abbildung 11: Ratio der Enzymmengen der löslichen zur unlöslichen Proteinfraction | 52 |
| Abbildung 12: Oligomerisierungsprofile der WT-PAH und varianter PAH | 55 |
| Abbildung 13: SDS-PAGE aufgereinigter PAH-Varianten | 57 |
| Abbildung 14: Qualitätskontrolle der Amylose-Fractionen nach Affinitätschromatographie | 58 |
| Abbildung 15: Qualitätskontrolle aufgereinigter PAH-Proteine im Vektor pMalc2e | 59 |
| Abbildung 16: Native Gele | 60 |
| Abbildung 17: PAH <i>activity landscapes</i> der WT-PAH und von PAH-Varianten | 65 |
| Abbildung 18: Immunoblot und graphische Darstellung der PAH-Proteinmengen | 72 |
| Abbildung 19: Darstellung der genotypspezifischen klinischen Phänotypen und der genotypspezifischen BH ₄ -Responsivität von Mutationen, die der Gruppe 1 und 2 zugeordnet wurden | 76 |
| Abbildung 20: Darstellung der genotypspezifischen klinischen Phänotypen und der genotypspezifischen BH ₄ -Responsivität von Mutationen, die der Gruppe 3 und 4 zugeordnet wurden | 78 |

1 EINLEITUNG

Dr. Charles R. Scriver schrieb 1995 über die Weiterführung der Forschung im Bereich der Hyperphenylalaninämie: „[...] Sprech mit den Familien, die wissen, was Phenylketonurie war und was es jetzt ist [...]. Phenylketonurie ist der Inbegriff der Wissenschaft und Medizin. Es illustriert, wie klinische Chemie, Biochemie und Genetik den Bereich der Unkenntnis dezimieren und wie Personen und Familien davon profitieren“ (Scriver, 1995).

Die Phenylketonurie (PKU; OMIM# 261600) ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung, die eine Intoleranz der essentiellen Aminosäure Phenylalanin verursacht (Mitchell, 2011, Underhaug, 2012). Die Einschränkung bzw. der Verlust der Enzymaktivität der Phenylalaninhydroxylase (PAH; EC 1.14.16.1) wird durch Mutationen im *Phenylalaninhydroxylase*-Gen (Chromosom 12q23.2; OMIM# 612349) verursacht und führt zu Hyperphenylalaninämie, die eine schwere mentale Retardierung bedingen kann (Scriver, 1988, Gassió, 2003, Fiege and Blau, 2007, Waisbren, 2007, Burlina and Blau, 2009, Blau, 2010b).

1.1 Phenylketonurie: Historischer Hintergrund

Dr. Asbjørn Følling, ein norwegischer Biochemiker und Arzt, entdeckte 1934 die Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure im Urin zweier mental retardierter Kinder und bezeichnete dieses Phänomen als *imbecillitas phenylpyruvica* (Følling, 1934, Corsellis, 1953, Christ, 2003). Diese Entdeckung führte zu einer 83-jährigen Geschichte der Wissenschaft, in der die PKU zum Prototyp genetischer, behandelbarer Stoffwechselerkrankungen wurde (Scriver, 2007, Dobrowolski, 2009, Blau, 2010b, Muntau and Gersting, 2010, Groselj, 2014).

Die Meilensteine der Geschichte der PKU werden im Folgenden aufgeführt:

- 1935: Lionel Penrose führt die Bezeichnung *Phenylketonurie* ein (Penrose, 1935, Penrose, 1937).
- 1953: Dr. George Jervis entdeckt, dass die Ursache der Erkrankung in einem Enzymdefekt begründet ist, der den Abbau von Phenylalanin zu Tyrosin einschränkt (Jervis, 1953, Heintz, 2013).
Im selben Jahr zeigt Prof. Dr. Dr. h.c. Horst Bickel, dass eine Behandlung des folgenschweren Enzymdefekts durch eine Phenylalanin-arme Diät

- möglich ist (Bickel, 1953). Diese führte zur Verbesserung der mentalen Entwicklung und der motorischen Fähigkeiten einer zweijährigen Patientin mit Phenylketonurie (Bickel, 1953, Muntau and Gersting, 2010).
- 1957: S. Kaufman entdeckt das defekte, krankheitsauslösende Enzym Phenylalaninhydroxylase (Kaufman, 1959) sowie kurz darauf den PAH-Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) (Kaufman, 1958, Kaufman, 1963).
- 1963: Dr. Robert Guthrie stellt ein effektives und günstiges Diagnoseverfahren für die Phenylketonurie vor (Guthrie and Susi, 1963, Guthrie, 1996). Damit kann in einem getrockneten Tropfen Fersenblut auf einer Filterpapierkarte eine Hyperphenylalaninämie des Kindes mittels eines Bakterieninhibitionstests nachgewiesen werden (Guthrie and Susi, 1963). Der sogenannte Guthrie-Test wird bald flächendeckend in den USA (Guthrie, 1996) und später auch in Europa zur Früherkennung der PKU bei Neugeborenen angewendet (Groselj, 2014). Heute wird das Neugeborenen-Screening für zwölf behandelbare endokrine und metabolische Krankheiten mittels Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt (Chace, 1993, Klein J., 2011, Groselj, 2014), (Muntau, 2009, Nennstiel-Ratzel, 2011).
- 1983: Woo *et al.* gelingt es erstmalig, das hepatische Enzym PAH zu isolieren und zu klonieren (Woo, 1983). Dadurch werden Analysen der Lokalisation des *PAH*-Gens im menschlichen Genom (Woo, 1983) und *in vitro* Expressionsanalysen durchführbar (Kayaalp, 1997, Mitchell, 2011).
- 1990: Das Maus Modell PAH^{hph-5} bzw. PAH^{enu1} mit PAH-Defekt wird eingeführt (McDonald, 1990). Durch Ethylnitrosoharnstoff (enu) werden Keimzellen mutagenisiert und Mutations-tragende Nachkommen erzeugt (McDonald J. D., 1988). Weitere Maus-Modelle (PAH^{enu2}, PAH^{enu3}) folgen (Shedlovsky, 1993).
- 1997: Durch die erfolgreiche Kristallisation von Abschnitten des PAH-Enzyms wird die Phenylalaninhydroxylase in dreidimensionaler Struktur dargestellt (Erlandsen and Stevens, 1999). Dadurch werden Analysen der Lokalisation einzelner Mutationen im Protein und die Erforschung der molekularen Mechanismen enzymatischer Phänotypen möglich (Erlandsen, 1997, Erlandsen and Stevens, 1999, Waters, 2003).
- 1990iger: Einführung der ersten lokusspezifischen PAH-Datenbank PAHdb (<http://www.PAHdb.mcgill.ca>), die seither umfangreiche Informationen

über das *PAH*-Gen und seine Allel-Variationen im humanen *PAH*-Lokus sammelt und international zugänglich macht (Hoang, 1996, Scriver, 2003).

- 1999: Kure *et al.* berichten von vier PKU-Patienten mit *PAH*-Defekt, die auf die Gabe des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin mit Abfall der Phenylalanin-Blutwerte reagieren (Kure, 1999).
- 2002: Muntau *et al.* berichten, dass die Gabe pharmakologischer Dosen von Tetrahydrobiopterin (BH_4) bei 80 % der Patienten mit einem Enzymdefekt mit Residualaktivität zu einer Normalisierung von Phenylalanin-Blutwerten und zu erhöhter Phenylalanin-Toleranz führt (Muntau, 2002). Darüber hinaus wird mittels ^{13}C -Phe-Oxidationstests nachgewiesen, dass BH_4 die *PAH*-Enzymaktivität normalisiert (Muntau, 2002). Dies führt zur Abgrenzung einer neuen phänotypischen Patientengruppe, deren Lebensqualität durch die Kofaktorgabe wesentlich verbessert werden kann (Muntau, 2002, Blau and Erlandsen, 2004, Cazzorla, 2014).
- 2007/2008: Die Wirksamkeit von Sapropterindihydrochlorid (Kuvan[®]), der synthetischen Form von 6R-Tetrahydrobiopterin, wird durch randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien belegt (Levy, 2007, Lee, 2008, Trefz, 2009) und wird 2007 in den USA (FDA) bzw. 2008 in Europa (EMA) (für Kinder > 4 Jahre) als *orphan drug* zugelassen (Muntau and Gersting, 2010, van Spronsen, 2010, Anjema, 2013).
- 2015: Die Europäische Kommission gibt nach positiver Empfehlung des Ausschusses für Humanarzneimittel (CHMP, Committee for Medicinal Products for Human Use), die Marktzulassung von Kuvan[®] für Kinder < 4 Jahre bekannt (Merck, 2015). Dabei stützt sich der Ausschuss auf Daten der SPARK-Studie (Safety Pediatric efficacy pharmacokinetic with Kuvan), einer Phase-IIIb-Studie, die Wirksamkeit und Sicherheit von Sapropterinhydrochlorid für Kinder < 4 Jahre belegt (Merck, 2014, Muntau, 2017).

1.2 Die Phenylketonurie

Die Phenylketonurie (PKU; OMIM #261600) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung (Penrose, 1935, Scriver, 1988, Williams, 2008, Zurflüh, 2008), die durch Mutationen im *Phenylalaninhydroxylase (PAH)*-Gen verursacht wird

(Chromosom 12q23.2; OMIM# 612349) (Woo, 1983, Scriver, 2007, Waisbren, 2007, Williams, 2008, Blau, 2010b). Die Folge ist ein Defekt des hepatischen Enzyms Phenylalanin-4-hydroxylase (Phenylalaninhydroxylase; PAH; EC 1.14.16.1), dessen verminderte Aktivität die Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure Phenylalanin (L-Phe) zu ihrem Produkt Tyrosin (L-Tyr) einschränkt bzw. vollständig verhindert (Jervis, 1953, Waisbren, 2007, Feillet, 2008, Muntau and Gersting, 2010, Mitchell, 2011). Unbehandelt manifestiert sich die PKU durch erhöhte Phenylalaninkonzentrationen im Blutplasma (Hyperphenylalaninämie), niedrig bis normale Tyrosin-Werte, aber vor allem durch eine schwere mentale Retardierung (Thompson, 1990, Moyle, 2007, Murphy, 2008, Trefz, 2009, de Groot, 2010, Mitchell, 2011).

Epidemiologie der Phenylketonurie

Die Phenylketonurie gehört zu den häufigsten angeborenen Aminosäurestoffwechselerkrankungen in Europa (Zschocke, 2003, Gersting, 2008) und stellt einen Prototyp der Proteinfaltungserkrankungen mit Funktionsverlust dar (Muntau and Gersting, 2010, Underhaug, 2012). Die Inzidenz der Phenylketonurie variiert weltweit stark und beträgt in Europa etwa 1/ 10.000 Lebendgeburten (Williams, 2008, Blau, 2010b).

Bei 1-2 % der Patienten werden Hyperphenylalaninämien nicht durch einen Defekt der PAH, sondern durch einen Mangel des essentiellen Kofaktors ((6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin) der PAH verursacht (de Baulny, 2007, Lang, 2009, Blau, 2010b). Die Genmutationen betreffen in diesen Fällen Enzyme, die an der Biosynthese oder Regeneration des Kofaktors beteiligt sind (Erlandsen and Stevens, 1999, Blau, 2006, Blau, 2010b, Mitchell, 2011).

Häufigkeit von Mutationen im PAH-Gen

Haute sind insgesamt 991 Mutationen im *PAH*-Gen bekannt (www.biopku.org) (22.05.2017). Dabei handelt es sich am häufigsten um *missense* Mutationen (60 %) (www.pahdb.mcgill.ca) (22.05.2017). Zudem kommen Deletionen, Insertionen, *splice site* Mutationen sowie *silente* und *nonsense* Mutationen im *PAH*-Gen vor (www.pahdb.mcgill.ca, www.hgmd.cf.ac.uk).

Klassifikation der Phenylketonurie

Zwei Parameter werden traditionell angewendet, um PKU-Patienten nach ihrem metabolischen Phänotyp zu klassifizieren: Die L-Phe-Konzentration im Blut (ohne

diätische Behandlung) und die tägliche L-Phe-Toleranz (Menge aufgenommenen Phenylalanins bei L-Phe-Blutwerten innerhalb des therapeutischen Zielbereichs) (Pey, 2007, Feillet, 2010, Blau, 2011, Heintz, 2013). Das Spektrum der Hyperphenylalaninämie (HPA) reicht von milder HPA (MHPA) über milde Phenylketonurie (milde PKU) bis zur klassischen PKU (Tabelle 1) (Guldborg, 1998, Waters, 2003, Zurflüh, 2008, Dobrowolski, 2009, Blau, 2011, Keil, 2013).

Die Klassifikation des klinischen Phänotyps anhand der L-Phe-Werte ist problematisch, weil bei Verdacht auf Phenylketonurie eines Neugeborenen eine sofortige Behandlung erfolgt und die Phenylalanin-Werte im Blut, aufgrund des in Deutschland bereits am dritten Lebenstag durchgeführten Neugeborenen Screenings, in der Regel noch nicht ihren Maximalwert erreicht haben (Blau, 2011, Camp and Parisi, 2014). Dies birgt die Gefahr, dass der Patient falsch klassifiziert wird (Blau, 2011, Camp and Parisi, 2014). Die Einteilung nach Phenylalanin-Toleranz kann nur bei guter Compliance der Patienten und strenger Überwachung der Phenylalanin-Aufnahme durchgeführt werden (Blau, 2010b, Blau, 2011).

Im Rahmen der „*Phenylketonuria Scientific Review Conference 2014*“ wurde eine alternative Klassifikation der PKU vorgestellt (Camp and Parisi, 2014). Hier wurde die milde Hyperphenylalaninämie nochmals unterteilt in die *mild-HPA-NT* (NT: engl.: *no treatment* (dt.: keine Behandlung)) für Phenylalaninkonzentrationen von 120-360 µmol/l und die *mild-HPA-gray zone* (dt.: Grauzone) mit L-Phe-Werten von 360-600 µmol/l (Camp and Parisi, 2014). Bei Letztgenannter sind sich Wissenschaftler uneinig, ob eine Behandlungsindikation besteht (Feillet, 2010, Blau, 2010a, Hanley, 2011, van Spronsen, 2011a, Camp and Parisi, 2014, van Spronsen, 2017). Die europäischen Leitlinien empfehlen aktuell die Behandlung bei Kindern mit L-Phe-Werten > 360 µmol/l (van Spronsen, 2017).

Die Entdeckung, dass ein substantieller Anteil von Patienten mit Defekt der PAH auf pharmakologische Dosen von BH₄ anspricht, hat zu einer zusätzlichen Erweiterung des phänotypischen Spektrums geführt (Muntau, 2002, Blau and Erlandsen, 2004). Die Einteilung erfolgt in BH₄-responsive Patienten und BH₄-nicht responsive Patienten (Blau and Erlandsen, 2004, Zurflüh, 2005, Quirk, 2012, Vockley, 2014). Patienten mit BH₄-reponsivem PAH-Defekt gehören meist zu der Gruppe der MHPA oder milder PKU (Muntau, 2002, Blau and Erlandsen, 2004, Feillet, 2010, Blau, 2011, Zimmermann, 2012).

Tabelle 1: Einteilung der Phenylketonurie

| Klassifikation | L-Phe-Blutwerte ^a | L -Phe Toleranz ^b | Kognitive Entwicklung |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|
| Milde Hyper-phenylalaninämie | 120-600 µmol/l | > 600 mg/d > 50 mg/kg/d | Minimales Risiko kognitiver Beeinträchtigung; normale Entwicklung; kaum diätische Einschränkungen |
| Milde PKU | 600-1200 µmol/l | 400-600 mg/d 20–50 mg/kg/d | Der IQ ist bei ausbleibender Therapie unterschiedlich stark beeinträchtigt |
| Klassische PKU | > 1200 µmol/l | 250 mg/d 20 mg/kg/d | Unbehandelt schwerste irreversible mentale Retardierung |
| Normalwerte | 30-120 µmol/l | | |

^a Bezieht sich auf Phenylalanin-Werte im Blut ohne diätische oder pharmakologische Therapie.

^b Die maximale Menge aufgenommenen Phenylalanins am Tag bei L-Phe-Blutwerten im therapeutischen Zielbereich.

(Kayaalp, 1997, Guldborg, 1998, Pey, 2007, Muntau, 2002, Blau, 2010b, Camp and Parisi, 2014)

Genotyp- Phänotyp-Korrelation

Die Vorhersage des BH₄-responsiven Phänotyps mittels Genotyp ist mit Hilfe von *PAH*-Datenbanken möglich (Dobrowolski, 2009, Quirk, 2012), aber inkonsistent (Vockley, 2014, Danecka, 2015).

Allgemein bestimmt der Genotyp den metabolischen Phänotyp (Guldborg, 1998, Zurflüh, 2008, Blau, 2011, Heintz, 2013) über die *PAH*-Restaktivität *in vivo* (Danecka, 2015). Eine zuverlässige Vorhersage des metabolischen Phänotyps durch den *PAH*-Genotyp wird jedoch durch Locusheterogenität (Scriver, 1995, Kayaalp, 1997, Guldborg, 1998), interallelische Komplementation (Scriver, 2007, Williams, 2008, Blau, 2011, Keil, 2013) und häufige *compound* Heterozygotie (Heintz, 2013, Danecka, 2015) erschwert.

Die variable Expressivität (unterschiedliche klinische Manifestation bei gleicher Mutation (Schaaf and Zschoke, 2013)) zeigt deutlich, dass die Anwendung eines klassischen ein-Gen/eine-Krankheit-Modells hier nicht erfolgen kann (Scriver and Waters, 1999, Sahni, 2013). Zum Beispiel zeigt die homozygote *PAH*-Mutation p.Arg261Gln unterschiedliche Ausprägungen des metabolischen Phänotyps (www.biopku.org, Blau, 2011), während die homozygote *PAH*-Variante p.Leu48Ser Inkonsistenzen bezüglich der Kofaktor-Responsivität aufweist (www.biopku.org, Blau,

2011, Staudigl and Gersting, 2011). Darüber hinaus berücksichtigt die Vorhersage der BH₄-Responsivität alleine durch den Genotyp nicht, dass auch der metabolische Status (Substratkonzentration) einen Einfluss auf die Enzymfunktion und die pharmakologische Wirkung des Kofaktors hat (Gersting, 2010, Staudigl and Gersting, 2011, Heintz, 2013).

Aktuelle Klassifikationsschemata bilden das breite Spektrum an Phänotypen durch die zugrunde liegende genetische Heterogenität nur ungenügend ab (Mitchell, 2011). Daher ist für PKU-Patienten eine individualisierte, auf die Bedürfnisse des einzelnen Patienten abgestimmte, Behandlung entscheidend.

Für die Beurteilung des metabolischen Phänotyps im Patienten ist die Kenntnis der genotypspezifischen PAH-Enzymaktivität erforderlich. Gersting und Staudigl *et al.* haben daher eine Fluoreszenz-basierte Methode entwickelt, die die Bestimmung der PAH-Enzymaktivität bei einer Vielzahl unterschiedlicher Substrat-(Phe) und Kofaktor-Konzentrationen (BH₄) automatisiert am gereinigten Protein oder aus Zellkultur erlaubt (Gersting and Staudigl, 2010, Staudigl and Gersting, 2011). Die Ergebnisse werden als farbcodierter *activity landscape* dargestellt und ermöglichen die Bestimmung des PAH-Arbeitsoptimums im metabolischen (Phe) und pharmakologischen (BH₄) Kontext (Staudigl and Gersting, 2011, Danecka, 2015).

Diagnosestellung der Phenylketonurie

Neugeborene mit HPA zeigen, außer einer Tendenz zu niedrigem Geburtsgewicht und kleinerem Kopfumfang (Mitchell, 2011), keine physischen Auffälligkeiten (Mitchell, 2011, Schaaf and Zschoke, 2013).

Bei Verdacht auf eine persistierende Hyperphenylalaninämie durch das Neugeborenencreening verifiziert eine quantitative, serologische Analyse der Phenylalaninkonzentration (>120 µmol/l), der Phe:Tyr Ratio (> 2) und eines Aminosäuren-Profiles die Diagnose (Blau, 2010b, Mitchell, 2011, Vockley, 2014). Differentialdiagnostisch sollte ein Tetrahydrobiopterinmangel (Blau, 2006, Fernandes, 2006, Harding and Blau, 2010, Mitchell, 2011) durch Bestimmung der Pterine (Neopterin, Biopterin, Primapterin) und der Dihydropteridin-Reduktase (DHPR)-Enzymaktivität im Trockenblut ausgeschlossen werden (Opladen and Blau, 2014). Weiterhin sollte ein BH₄-Belastungstest mit 20 mg/kg Körpergewicht Tetrahydrobiopterin erfolgen. Ein Abfall der Phenylalaninkonzentration im Blut (> 30 %) nach 24 h bestätigt die BH₄-Responsivität des Patienten (Fiege and Blau, 2007, Dobrowolski, 2009, Blau, 2011, Heintz, 2013). Zur Sicherung der genetischen

Diagnose sollte zusätzlich eine molekulargenetische Untersuchung des *PAH*-Gens erfolgen (Vockley, 2014).

1.3 Klinisches Bild der Phenylketonurie

Bei unbehandelten Kindern mit klassischer PKU steht der hochgradige, zumeist progrediente mentale Entwicklungsrückstand im Vordergrund (Muntau, 2000), der mit progressiver intellektueller Beeinträchtigung, Mikrozephalie, epileptischen Anfällen, Autismus, motorischen Defiziten und Autoaggression einhergehen kann (Bickel, 1953, Blau, 2010b, Mitchell, 2011, van Spronsen, 2011b). Ebenso können Tremor, spastische Paresen, Pyramidenbahnzeichen, parkinsonoide Symptome mit hyperkinetischem Bewegungsmuster und Hyperreflexie auftreten (Thompson, 1990, Muntau, 2000, Fernandes, 2006, van Spronsen, 2011b).

Die Exkretion von Phenylalanin und seinen Metaboliten können einen moderigen Körpergeruch und Symptome wie z.B. Ekzeme hervorrufen (Braun-Falco, 1991, Fernandes, 2006, Mitchell, 2011). Durch eine verminderte Melaninsynthese, die höchstwahrscheinlich durch die Inhibition der Tyrosinhydroxylase bei erhöhten L-Phe-Konzentrationen ausgelöst wird (Hassel, 1959, Thöny, 2014), haben die Patienten häufig eine verminderte Pigmentation, die sich in heller Haut, blonden Haare und blauen Augen äußert (Braun-Falco, 1991, Fernandes, 2006, Thöny, 2014).

Durch die Einführung des Neugeborenen Screenings und der diätischen Therapie konnten die schwerwiegenden neurologischen Konsequenzen der Hyperphenylalanämie größtenteils eliminiert werden (Sharman, 2010, Feillet, 2010, Brumm, 2010, Mitchell, 2011). Behandelte PKU-Patienten zeigen, verglichen mit gesunden Geschwistern und Kindern mit anderen chronischen Erkrankungen, eine erhöhte Rate psychiatrischer Probleme (Brumm, 2010, Mitchell, 2011, Yano, 2013). Darüber hinaus konnten auch bei frühzeitig behandelten Kindern und Adoleszenten eine höhere Frequenz von Hyperaktivität, ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung) und Impulsivität, verminderte Autonomie und vermehrte Schulprobleme festgestellt werden (Matalon, 2007, Brumm, 2010, Mitchell, 2011, Camp and Parisi, 2014). Verhaltensauffälligkeiten und psychiatrische Symptome wie Depression, Angststörungen und Phobien können sich in den späteren Lebensdekaden manifestieren (de Groot, 2010, Brumm, 2010, Blau, 2010b, Mitchell, 2011).

Erwachsene, früh behandelte Patienten haben trotz guter metabolischer Kontrolle in der Kindheit häufig einen niedrigeren Intelligenzquotienten (IQ) im Vergleich zu Geschwistern und Eltern oder zu gesunden Vergleichsgruppen (Waisbren, 2007, Moyle, 2007, Feillet, 2010, Hood, 2014). Einige Studien haben zusätzlich gezeigt, dass stark fluktuierende Phenylalaninkonzentrationen mit einem niedrigeren neurokognitiven Outcome assoziiert sind (Koch, 2002, Anastasoie, 2008, Clearly, 2013, Trefz, 2015).

1.3.1 Biochemie des Phenylalanin-Stoffwechsels

Die Phenylalaninhydroxylase (PAH) ist ein nicht-Häm-Eisen Enzym, das die Hydroxylierung der essentiellen, aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin (L-Phe) zur nicht-essentiellen, aromatischen Aminosäure L-Tyrosin (L-Tyr) unter Verbrauch des Kofaktors Tetrahydrobiopterin ((6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; BH₄) und molekularem Sauerstoff katalysiert (Erlandsen and Stevens, 1999, Abu-Omar, 2005, Pey, 2007, Gersting and Staudigl, 2010). Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Phenylalanin-Katabolismus (Fusetti, 1998, Moyle, 2007, Zurflüh, 2008, Williams, 2008). Dieser findet zum größten Teil in der Leber, aber auch in der Niere statt und macht ca. 75 % des L-Phe-Abbaus aus (Waters, 1998, Williams, 2008, Flydal and Martinez, 2013). Die PAH gehört zu den aromatischen Amino-Hydroxylasen, wie auch die Tyrosinhydroxylase (TyrH) und die Tryptophanhydroxylase (TrpH) (Kobe, 1999, Abu-Omar, 2005, Fitzpatrick, 2012, Flydal and Martinez, 2013).

Das Hydroxylierungssystem des Phenylalanin-Stoffwechsels besteht aus der Monooxygenase PAH, dem unkonjugierten Pterin-Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Enzymen, die BH₄ regenerieren: Dihydropteridin-Reduktase (DHPR) und Pterin-Carbinolamin-Dehydratase (PCD) (Williams, 2008, de Groot, 2010, Underhaug, 2012). Die PAH führt ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff zur Bildung einer Hydroxygruppe am aromatischen Ring des Substrats ein (Doenecke, 2005, Flydal and Martinez, 2013, Abu-Omar, 2005) (Abbildung 1). Tetrahydrobiopterin fungiert als Elektronenquelle, nimmt das verbleibende Sauerstoffatom auf und wird zu pterin-4 α -Carbinolamin oxidiert (4 α -OH-BH₄) (Abu-Omar, 2005, Harding and Blau, 2010, Flydal and Martinez, 2013). Die PCD dehydriert 4 α -OH-BH₄ zu chinoid Dihydrobiopterin (qBH₂), wodurch das Nebenprodukt H₂O entsteht (Fitzpatrick, 2003, Underhaug, 2012, Flydal and Martinez, 2013).

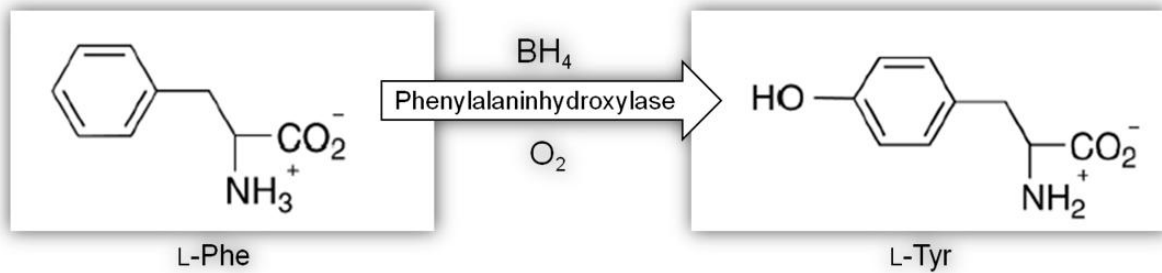


Abbildung 1: Reaktion der Phenylalaninhydroxylase

Die Hydroxylierung von L-Phenylalanin zu L-Tyrosin wird von der PAH katalysiert. Die Reaktion benötigt den Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) und molekularen Sauerstoff (O_2).

BH_4 wird anschließend durch die DHPR regeneriert (Abu-Omar, 2005, Fernandes, 2006, Underhaug, 2012, Flydal and Martinez, 2013) (Abbildung 2).

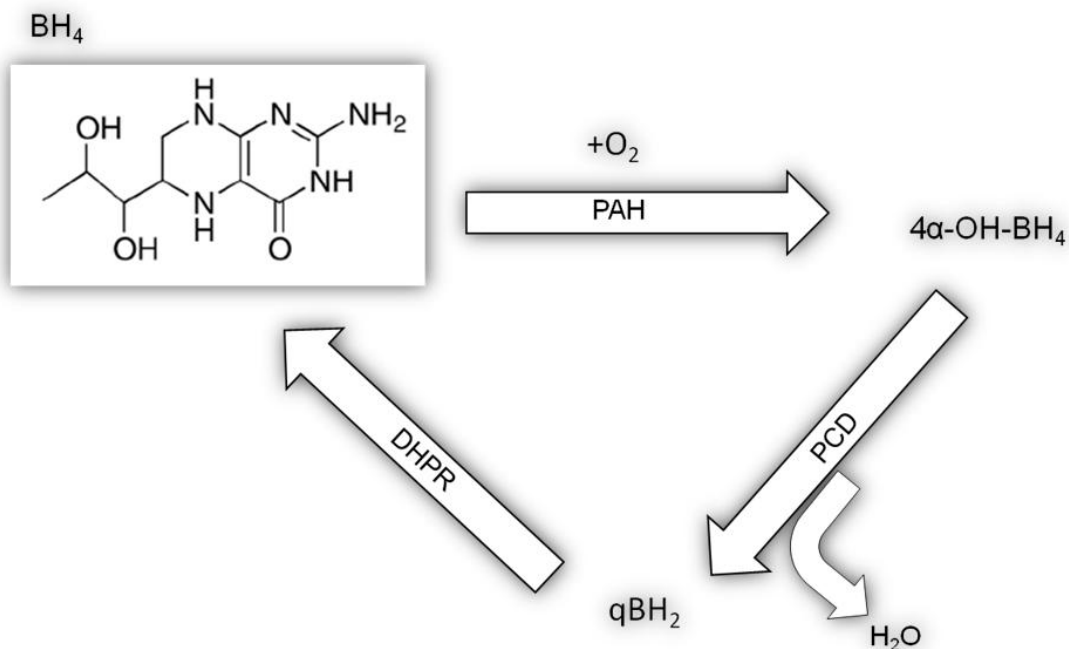


Abbildung 2: Regeneration von Tetrahydrobiopterin

BH_4 wird durch die PAH-Reaktion zu $4\alpha\text{-OH-BH}_4$ oxidiert und wird anschließend durch die PCD und DHPR regeneriert.

Ist der Abbau von Phenylalanin durch einen Enzymdefekt eingeschränkt, ereignet sich vermehrt ein alternativer Katabolismus, bei dem Phenylpyruvat, Phenylacetat und Phenyllaktat durch Transaminierung entstehen (Fernandes, 2006, de Groot, 2010, Flydal and Martinez, 2013). Diese Phenylketone werden über den Urin ausgeschieden (Braun-Falco, 1991, Fernandes, 2006). Tyrosin, das Produkt der Reaktion der PAH, wird im Weiteren für die Synthese des biogenen Amins Dopamin, Melanin und den

Katecholaminen Noradrenalin und Adrenalin benötigt (Fernandes, 2006, de Groot, 2010) (Abbildung 3).

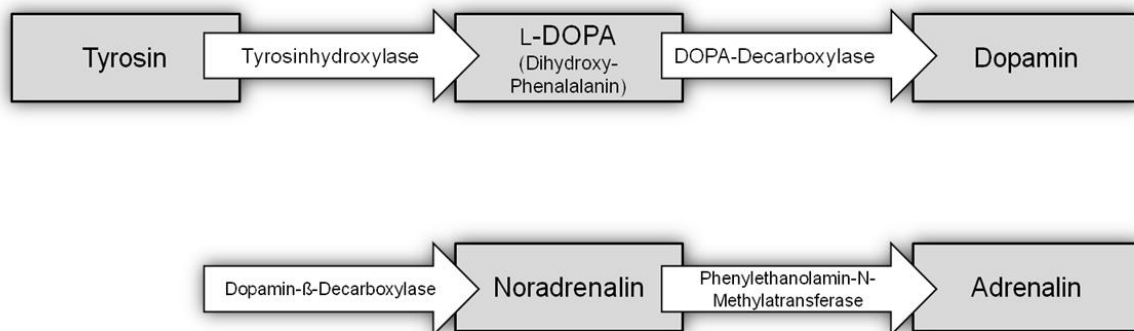


Abbildung 3: Tyrosin als Ausgangssubstanz für Dopamin, Melanin und Katecholamine

Die Tyrosinhydroxylase katalysiert die Umwandlung von Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). L-DOPA wird im Folgenden zu Dopamin konvertiert, welches weiterhin zu Noradrenalin und Adrenalin metabolisiert werden kann. In weiteren Reaktionen wird Melanin aus L-DOPA gebildet (hier nicht abgebildet).

1.3.2 Regulation und Struktur der Phenylalaninhydroxylase

Die PAH setzt sich aus insgesamt 452 Aminosäuren zusammen und weist ein molekulares Gewicht von ca. 52 kDa auf (Erlandsen and Stevens, 1999, Flatmark and Stevens, 1999, Cerreto, 2011). Die PAH ist ein asymmetrisches Dimer aus Dimeren und beinhaltet drei funktionelle Domänen pro Monomer (Fusetti, 1998, Flatmark and Stevens, 1999, Pey, 2007), die N-terminale regulatorische Domäne (Aminosäurenreste 1-142), die katalytische Domäne (Aminosäurenreste 143-410) und die C-terminale Oligomerisierungs-Domäne (Aminosäurenreste 411-452) (Fusetti, 1998, Gersting, 2008, Heintz, 2013) (Abbildung 4 A).

Die Oligomerisierungs-Domäne bildet höhere Proteinstrukturen durch die Bindung der Monomere untereinander aus (Erlandsen, 1997, Williams, 2008, Gersting, 2008). Sie setzt sich aus einer Dimerisierungseinheit, die eine Verbindung der Monomere durch antiparallele β-Faltblattstrukturen vermittelt und einer Tetramerisationseinheit zusammen (Erlandsen and Stevens, 1999, Flydal and Martinez, 2013). Letztere bewirkt eine Angliederung der Dimere durch Doppelhelix (Erlandsen and Stevens, 1999, Flydal and Martinez, 2013) (Abbildung 4 B). Die Phenylalaninhydroxylase liegt in einem pH-abhängigen Equilibrium aus Homotetrameren und Homodimeren vor (Martinez, 1995, Erlandsen and Stevens, 1999, Williams, 2008, Mitchell, 2011). Die katalytische Domäne verfügt über Bindungsstellen für Substrat, Kofaktor und Eisen (Andersen, 2001, Fitzpatrick, 2003, Gersting, 2008).

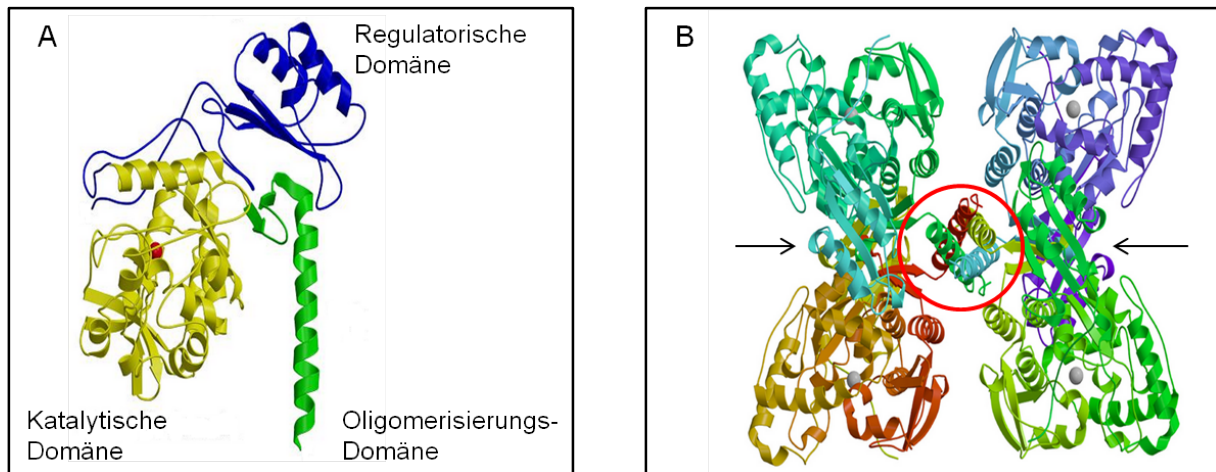


Abbildung 4: Struktur der Phenylalaninhydroxylase

(A) PAH-Monomer mit N-terminaler regulatorischer Domäne (blau), katalytischer Domäne (gelb) mit Eisen (rot) und Oligomerisierungsdomäne (grün). (B) PAH-Tetramer: Verbindung der PAH-Monomere durch β -Falblattstrukturen (Pfeile) und Doppelhelix (Kreis).

Quelle: (Erlandsen and Stevens, 1999). Die Abbildung wurde modifiziert.

Die Bindung des Kofaktors führt zur Bindung eines inaktiven PAH-BH₄-Komplexes (Jennings, 2001, Gersting and Staudigl, 2010, Underhaug, 2012, Heintz, 2013). Tetrahydrobiopterin interagiert mit der N-terminalen autoregulatorischen Sequenz (s.u.) und der Pterin-Bindungs-Schleife und bildet Wasserstoffbrückenbindungen (Teigen and Martinez, 2003, Erlandsen and Pey, 2004, Gersting and Staudigl, 2010, Underhaug, 2012, Santos-Sierra, 2012). Dadurch wird der Enzym-Kofaktor-Komplex stabilisiert (Erlandsen and Pey, 2004, Gersting and Staudigl, 2010, Underhaug, 2012). Durch diese BH₄-induzierte PAH-Inhibition kann der vollständige Abbau der essentiellen Aminosäure Phenylalanin verhindert werden (Kobe, 1999, Jennings, 2001, Staudigl and Gersting, 2011, Santos-Sierra, 2012, Fitzpatrick, 2012).

Im Gegensatz dazu wird die PAH durch die Bindung ihres Substrats (Phenylalanin) aktiviert (Shiman, 1980, Kaufman and Mason, 1982, Knappskog, 1996, Kobe, 1999, Jennings, 2001, Gersting and Staudigl, 2010, Fitzpatrick, 2012, Underhaug, 2012). Die Substratbindung führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Enzyms (Jennings, 2001, Cerreto, 2011, Fitzpatrick, 2012, Jaffe, 2013) und induziert eine positive Kooperativität zu Phenylalanin (Gersting, 2008, Underhaug, 2012, Fitzpatrick, 2012, Heintz, 2013). Die Anwesenheit des Substrats verschiebt zusätzlich das Equilibrium von Tetrameren und Dimeren zugunsten der Tetramere (Martinez, 1995, Cerreto, 2011, Jaffe, 2013). Die genannten Mechanismen führen zur vollen katalytischen Aktivität der PAH nach L-Phe Aufnahme (Shiman, 1980, Kaufman and Mason, 1982, Shiman, 1994, Staudigl and Gersting, 2011, Jaffe, 2013). Zudem

begünstigt die Konformationsänderung des aktivierten Enzyms eine positive Kooperativität zum Kofaktor (Gersting and Staudigl, 2010).

Die N-terminale, regulatorische Domäne beinhaltet einen Serin-Rest (Ser 16) und eine intrinsische autoregulatorische Sequenz, die sich bis zum aktiven Zentrum der katalytischen Domäne erstreckt (Erlandsen, 1997, Kobe, 1999, Gersting, 2008, Williams, 2008, Flydal and Martinez, 2013). Der Serin-Rest trägt zu den Kontrollmechanismen der PAH bei und kann durch cAMP-abhängige und Ca^{2+} /Calmodulin Proteinkinasen phosphoryliert werden (Andersen, 2001, Williams, 2008). Im phosphorylierten Zustand reichen niedrigere L-Phe-Konzentrationen aus, um das Enzym zu aktivieren (Kobe, 1999, Jennings, 2001, Underhaug, 2012). Es wird vermutet, dass die intrinsische autoregulatorische Sequenz durch ihre flexible Verbindung zur katalytischen Domäne die Bindung des Substrats bei niedrigen L-Phe Konzentrationen einschränken kann (Jennings, 2001, Fitzpatrick, 2012, Flydal and Martinez, 2013).

1.3.3 Molekularer Mechanismus des Funktionsverlustes der PAH

Der Phenylketonurie zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismus kann, kurz zusammengefasst, wie folgt beschrieben werden: Je größer der strukturelle Effekt der Genmutation auf die PAH, desto geringer ist die Aktivität des Enzyms und desto schwerer präsentiert sich der klinische Phänotyp (Pey, 2007).

Molekulare Basis und Ursache der PKU sind meist *missense* Mutationen im *PAH*-Gen, die zu Proteinfehlfaltung mit Funktionsverlust des Enzyms führen (Waters, 2003, Pey, 2007, Gersting, 2008, Gersting and Staudigl, 2010, Flydal and Martinez, 2013).

Seinen funktionellen Status erreicht ein Protein durch dreidimensionale Faltung während oder nach der Translation am Ribosom (Hartl, 2011, Kim, 2013, Muntau, 2014). Die Information für die native Faltung liegt in der Primärstruktur, der Aminosäuresequenz, vor (Anfinsen, 1973). So reicht der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der Polypeptidkettensequenz durch *missense* Mutationen im *PAH*-Gen aus, um Proteinfehlfaltung zu bedingen (Scriver, 2007, Muntau and Gersting, 2010, Muntau, 2014). Die Folgen können globale, strukturelle Umlagerungen des Enzyms sein, die eine funktionelle Beeinträchtigung von Allosterie, Stabilität und Faltung der PAH verursachen (Scriver, 2007, Gersting, 2008). Hinzu kommt, dass das Enzym durch die mutationsbedingte Fehlfaltung vermehrt zum Substrat des Ubiquitin-

Proteasom-Systems wird und eine verfrühte Degradation des Proteins erfolgt (Blau and Erlandsen, 2004, Underhaug, 2012, Muntau, 2014).

Überdies kann die PAH durch Exposition hydrophober Aminosäurenreste, die bei partieller Faltung und vor Einnahme des nativen Zustandes präsentiert werden, aggregieren (Hartl, 2011, Muntau, 2014, Mattoo, 2014). Die Mutation schränkt letztlich die katalytische Aktivität der PAH ein, aber die Auswirkungen der Mutationen betreffen vor allem die regulatorischen Prozesse des Enzyms, die die Aktivierung und Inhibition von Substrat- und Kofaktorbindingen beeinflussen (Gersting, 2008, Muntau and Gersting, 2010). Zudem können Mutationen Auswirkungen auf die Oligomerisierung des Proteins haben (Gersting, 2008).

Zusammenfassend induzieren *missense* Mutationen im *PAH*-Gen eine reduzierte Faltungseffizienz, eine reduzierte thermische und proteolytische Stabilität, damit die vermehrte Proteindegradation sowie Aggregation (Gersting, 2008, Muntau and Gersting, 2010). Eine Kombination dieser Prozesse bedingt den Funktionsverlust der PAH (Muntau and Gersting, 2010).

In pharmakologischen Dosen bindet BH_4 an das fehlgefaltete Protein und korrigiert die Trias molekularer Veränderungen aus Proteinefehlfaltung, Aggregation und beschleunigter Proteindegradation (Gersting, 2010). Hierdurch wird das PAH-Protein stabilisiert und die intrazellulär verfügbare Menge an funktioneller PAH erhöht (Gersting, 2010). Diese Erkenntnisse führten zur Einführung von BH_4 als pharmakologisches Chaperon und für die medikamentöse Therapie fehlfaltungsbedingter PAH-Defekte (Gersting and Staudigl, 2010, Vockley, 2014, Trefz, 2015). BH_4 ist damit als *first-in-class*-Medikament einzustufen.

1.4 Therapie der Phenylketonurie

Hauptursache der Symptome der PKU sind die neurotoxischen Effekte der Hyperphenylalaninämie (Thompson, 1990, Gjetting, 2001, Williams, 2008, Martynyuk, 2010). Das Therapieziel sollte daher sein, die Phenylalaninkonzentrationen im Blutplasma im therapeutischen Zielbereich zu halten, ohne dass Mangelercheinungen der essentiellen Aminosäure Phenylalanin, der nicht-essentiellen Aminosäure Tyrosin oder anderer Nährstoffe auftreten (Harding and Blau, 2010, Flydal and Martinez, 2013, Vockley, 2014).

1.4.1 Diätische Behandlung

Für ein optimales neurologisches outcome bei PKU-Patienten sind Ziel-Blutplasmawerte der Phenylalaninkonzentration zwischen 120 und 360 $\mu\text{mol/l}$ in der ersten Lebensdekade essentiell (Blau, 2009, Mitchell, 2011, Vockley, 2014, van Spronsen, 2017).

Dafür sollte eine phenylalaninarme bzw. je nach L-Phe-Blutwerten bei Diagnosestellung sogar zunächst eine phenylalaninfreie Diät eingeführt werden (Feillet, 2008, Vockley, 2014, van Spronsen, 2017). Ist eine phenylalaninarme Diät möglich, kann Muttermilch in Kombination mit einer L-Phe-freien Aminosäurenmischung gefüttert werden (Waisbren, 2007, Vockley, 2014, van Spronsen, 2017). Diese enthalten essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren, um den Nährstoffbedarf der Kinder zu decken (Blau, 2009, Mitchell, 2011).

Die Zufuhr an natürlichem Protein sollte an die individuelle L-Phe-Toleranz des Patienten (s. auch Tabelle 1 in 1.2) angepasst werden (Mitchell, 2011). Die Protein- und Energiemengen sollten dem Alter entsprechen und an Wachstum, Krankheit und Aktivität des Kindes adaptiert werden (Mitchell, 2011). Die Diät sollte in der 1. bis 2. Lebenswoche beginnen (Blau, 2009). Es wird davon ausgegangen, dass eine lebenslange Diät von Vorteil für die neurologische und psychiatrische Verfassung der Patienten ist, jedoch ist die Compliance der Patienten vor allem in der Adoleszenz und im Erwachsenenalter gering (Walter and White, 2004, Ding, 2004, Feillet, 2008, Ney, 2009, Blau, 2009, Blau, 2010b, Harding and Blau, 2010). Neben den Einschränkungen im Alltag ist es vor allem der Geschmack der Aminosäuremischungen, der eine konsequente Einhaltung der Diät erschwert (Ney, 2009). Glycomacropeptid ist ein Nebenprodukt der Käseherstellung, das nur geringe Mengen Phenylalanin enthält und trotzdem eine gute Proteinquelle darstellt (Ney, 2009, van Spronsen, 2010, Vockley, 2014). Es soll über geschmackliche Vorteile verfügen und damit die Adhärenz verbessern (Ney, 2009, Vockley, 2014).

1.4.2 Tetrahydrobiopterin als pharmakologische Therapie

Die Einführung des Kofaktors der PAH Tetrahydrobiopterin (Sapropterindihydrochlorid; Kuvan[®]) als pharmakologische Therapie der PKU in den USA (durch die FDA 2007) und in Europa (durch die EMA 2008) ermöglicht einem Teil der PKU-Patienten eine Lockerung der strikten, L-Phe-armen Diät (Muntau and Gersting, 2010, van Spronsen, 2010, Anjema, 2013).

BH₄ erhöht die Phenylalanintoleranz und senkt die L-Phe-Konzentrationen der Patienten durch Steigerung der PAH-Enzymaktivität (Muntau, 2002, Hennermann, 2005, Levy, 2007, Trefz, 2009, Vockley, 2014, Muntau, 2017). Letztlich kann durch weniger diätische Restriktionen die Compliance und Lebensqualität der PKU-Patienten gesteigert werden (Blau, 2009, Cazzorla, 2014, Bosch, 2015).

Eine Restaktivität des Enzyms ist jedoch meist Voraussetzung für die Verbesserung des metabolischen Status durch Tetrahydrobiopterin-Gabe (Muntau, 2002, Fiege and Blau, 2007, Burlina and Blau, 2009, Bélanger-Quintana, 2011). So gehören Patienten mit BH₄-responsivem PAH-Defekt meist zu der Gruppe der MHPA oder milder PKU (Bernegger and Blau, 2002, Muntau, 2002, Blau and Erlandsen, 2004, Fiege and Blau, 2007, Heintz, 2013). Die Daten über den prozentualen Anteil aller PKU-Patienten, die von einer BH₄ Therapie profitieren, sind inkonsistent. Die Zahl schwankt zwischen 20 und 60 % (Bernegger and Blau, 2002, Blau and Erlandsen, 2004, Feillet, 2010, Heintz, 2013, Keil, 2013).

Ein BH₄-Belastungstest gibt Aufschluss über eine mögliche BH₄-Responsivität (Dobrowolski, 2009, Blau, 2011, Bélanger-Quintana, 2011). Sinkt die L-Phe-Konzentration nach Gabe von 20 mg/kg BH₄ um > 30 % ab, gilt der Patient als BH₄-responsiv (Blau, 2006, Trefz, 2009, Harding and Blau, 2010, Bélanger-Quintana, 2011). Die tägliche orale Dosis Tetrahydrobiopterins in der Langzeittherapie beträgt 5-20 mg/kg Körpergewicht pro Tag (Feillet, 2008, Harding and Blau, 2010, Bélanger-Quintana, 2011, Camp and Parisi, 2014). Die Blutwerte sollten langfristig kontrolliert und dokumentiert werden (Bélanger-Quintana, 2011, Vockley, 2014). Vorhersagen der Kofaktor-Responsivität auf der Basis des Genotyps sind durch Befragung von PAH-Datenbanken möglich, aber inkonsistent (Bélanger-Quintana, 2011, Vockley, 2014, Danecka, 2015). Schwerwiegende Nebenwirkungen von Sapropterindichydrochlorid wurden bis jetzt nicht dokumentiert (Vockley, 2014, Somaraju and Merrin, 2015).

1.4.3 Zukünftige Therapieformen der PKU

Zukünftig sollen neue Therapieformen die Lebensqualität von PKU-Patienten weiter verbessern.

Im Rahmen klinischer Studien werden aktuell Wirksamkeit und Sicherheit von Polyethylenglycol-Phenylalaninammonia-Lyase (PEG-PAL) untersucht (van Spronsen, 2010, Bélanger-Quintana, 2011, Longo, 2014). Dieses Enzym soll durch tägliche subkutane Gaben überschüssiges Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure abbauen,

die über den Urin ausgeschieden werden kann (Bélanger-Quintana, 2011, Vockley, 2014, Longo, 2014, Blau and Longo, 2015).

Darüber hinaus wird über die Einnahme großer neutraler Aminosäuren (LNAA) diskutiert (Matalon, 2007, Camp and Parisi, 2014). Der Transport dieser Aminosäuren über die Bluthirnschranke ist durch hohe Phenylalaninkonzentrationen eingeschränkt, da sie den kompetitiv bindenden Transporter der Bluthirnschranke besetzen (Pardridge, 1998, Matalon, 2007, de Groot, 2010, van Spronsen, 2010, Yano, 2013). Wäre die Menge anderer Substrate des Transporters durch zusätzlich LNAA erhöht, würde durch bessere Wettbewerbsbedingungen weniger Phenylalanin und mehr andere neutrale Aminosäuren ins Gehirn transportiert (van Spronsen, 2010, Yano, 2013, Camp and Parisi, 2014, Strisciuglio and Concolino, 2014).

Eine weitere zukünftige Therapieform für die PKU könnte die Transplantation isolierter Hepatozyten bieten (Harding and Blau, 2010, Stéphenne, 2012, Mazariegos, 2014). Das Verfahren ist vielversprechend, wird aber durch einen Mangel an Leberzellspenden (Stéphenne, 2012) und schlechter Widerstandsfähigkeit der Hepatozyten gegenüber der Kryokonservierung eingeschränkt (Stéphenne, 2012, Hughes, 2012). Zudem verfügen die transplantierten Hepatozyten über keinen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den Empfänger-Leberzellen mit PAH-Defekt (Harding and Gibson, 2010) bzw. besteht ein eingeschränktes Replikationspotential und damit ist die Lebenszeit der Transplantate begrenzt (Stéphenne, 2012).

Die Forschung auf dem Gebiet der Gentherapie ergab, dass Vehikel (z.B. virale Vektoren: rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) 5 oder 8) für den Transfer funktioneller, rekombinanter *PAH*-Gene geeignet wären, um diese in die Portalvene zu injizieren (Ding, 2004, Ding, 2006, Ding, 2008, Harding and Blau, 2010, Strisciuglio and Concolino, 2014). Da die funktionellen Gene jedoch nicht in die Hepatozyten-DNS integriert werden, werden sie nach kurzfristiger Verbesserung des metabolischen Status abgebaut (Harding and Blau, 2010). Reinjektionen mit demselben Vektor-Serotyp führen durch Antikörperbildung zu Immunabwehr (Harding and Blau, 2010). Erforscht wird nun, ob die Injektion eines kompletten PAH-Hydroxylationssystems in den Muskel die Phenylalaninkonzentrationen senken kann (Ding, 2008, Harding and Blau, 2010).

Weitere Verbesserungen sind notwendig, um die oben genannten zu Therapieformen optimieren.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verständnis zu den Ursachen des fehlfaltungsbedingten Funktionsverlustes und den Einfluss des metabolischen Status auf die verbleibende Enzymfunktion häufiger varianter Phenylalaninhydroxylasen zu vertiefen.

Vorhersagen der BH₄-Responsivität und des metabolischen Phänotyps durch den zugrundeliegenden Genotyp in *PAH*-Datenbanken sind inkonsistent. Ein direkter Rückschluss von der Genmutation auf die klinischen Auswirkungen lassen außer Acht, dass auch der metabolische Status des Patienten die Aktivität der PAH beeinflusst, welche wiederum den metabolischen Phänotyp maßgeblich mitbestimmt. So sollte ein Zusammenhang zwischen dem Einfluss homozygoter Genotypen und der Substrat- und Kofaktor-Konzentration auf die PAH-Enzymfunktionen hergestellt werden. Letztlich können dadurch Korrelationen zwischen *in vitro* erhobenen Daten und klinischen Auswirkungen bei *PAH*-Mutationsträgern eruiert werden.

Zunächst sollten die 13 häufigsten *missense* Mutationen im *PAH*-Gen (www.pahdb.mcgill.ca) (entspricht 33 % der Patienten weltweit) durch Literaturrecherchen und Analysen von Datenbanken (www.biopku.org, www.pahdb.mcgill.ca) ermittelt und in einer cDNS-Bibliothek zusammengefasst werden. Die prokaryot exprimierten PAH- Varianten sollten hinsichtlich ihres molekularen Mechanismus der Fehlfaltung, durch Analyse der Faltungseffizienz und Stabilität und des Einflusses der Mutation auf die spezifische Enzymaktivität in einem standardisierten diskontinuierlichen *activity assay* im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden. Zudem sollten die mutierten Phenylalaninhydroxylasen im eukaryoten Zellsystem bezüglich der Residual-Enzymaktivitäten und der Restproteinmengen untersucht werden.

Des Weiteren sollte die katalytische Effizienz prokaryot exprimierter PAH in Abhängigkeit von physiologischen und pathologischen Substrat-, und physiologischen und therapeutischen Kofaktor-Konzentrationen in einer kontinuierlichen Messung ermittelt werden. Dadurch sollten die optimalen Funktionsbereiche der ausgewählten PAH Mutationsformen aufgezeigt werden.

Die Ermittlung der PAH-Arbeitsoptima für Substrat- und Kofaktor-Konzentrationen häufiger Genotypen können Ärzte bei der diätetischen und pharmakologischen Therapie für PKU-Patienten im klinischen Alltag unterstützen. Daraus ergeben sich neue Ansätze für individualisierte, Patienten-orientierte Therapiestrategien.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

| Produktbezeichnung | Firma |
|------------------------------------|-------|
| Ampicillin (gelöst in 50% Ethanol) | Serva |
| Kanamycin | Serva |

3.1.2 Antikörper

| Produktbezeichnung | Firma |
|--|--------------------------|
| <i>Anti-Phenylalanine-Hydroxylase (mouse monoclonal)</i> | Millipore |
| <i>β-Actin(4) HRP mouse monoclonal IgG</i> | Santa Cruz Biotechnology |
| <i>Goat anti-mouse IgG-HRP conjugated</i> | Santa Cruz Biotechnology |

3.1.3 Chemikalien und Substanzen

| Produktbezeichnung | Firma |
|--|------------------------------|
| Agarose | Biozym |
| 4-12% und 10% Bis-Tris Midi Gele 20 well NuPAGE® | novex® by life technologies™ |
| 4-16% Bis-Tris-Gele NativePAGE™ 10 well | novex® by life technologies™ |
| <i>Complete-Mini EDTA-free</i> | Roche AG |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | Bio-Rad Laboratories |
| <i>ECL Western Blotting Substrate</i> | Pierce®, Thermo Scientific |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH |
| <i>Ferrous Ammonium Sulfate</i> | Sigma-Aldrich |
| IPTG | Thermo Scientific |
| <i>LDS Sample Buffer (4x) NuPAGE®</i> | life technologies™ |

| | |
|--|----------------------------------|
| L-Phenylalanin und L-Tyrosin | Sigma-Aldrich |
| <i>Protein Assay-Dye Reagent Concentrate</i> | Bio-Rad Laboratories |
| peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I | Peqlab |
| Pure Yield™ Plasmid Maxi-prep System | Promega |
| <i>Sample Reducing Agent</i> (10x) NuPAGE® | life technologies™ |
| Sucrose Trypsin, ohne Phenolrot | Apotheke Innenstadt München |
| (6R)-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH4) | Schircks Laboratories |
| Triton® x-100 <i>reduced</i> | Sigma-Aldrich |
| <i>West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i> | Super Signal®, Thermo Scientific |

3.1.4 Enzyme

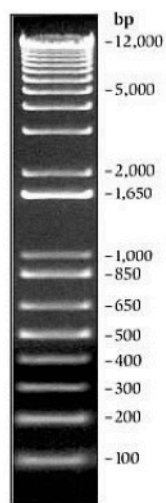
| Produktbezeichnung | Firma |
|--|--------------------|
| <i>Catalase from Bovine Liver</i> , 2,000-5,000 units/mg protein | Sigma-Aldrich |
| Gateway® BP-Clonase™ II Enzyme-Mix | life technologies™ |
| Gateway® LR-Clonase™ II Enzyme-Mix | life technologies™ |
| KAPA HiFi Hot Start PCR Kit | Peqlab |
| Proteinase K | life technologies™ |

| Restriktionsenzyme | Zugehöriger Puffer | Schnittstelle | Firma |
|-------------------------|------------------------------|---------------|-------------------|
| <i>BglII</i> | 1x <i>Buffer O</i> | A/GATCT | Thermo Scientific |
| <i>DpnI fast digest</i> | 1x <i>fast digest Buffer</i> | Gm6A/TC | Thermo Scientific |
| <i>EcoRI</i> | 1x <i>Buffer EcoRI</i> | G/AATTC | Thermo Scientific |
| <i>NotI</i> | 1x <i>Buffer O</i> | GCATG/C | Thermo Scientific |
| <i>XhoI fast digest</i> | 1x <i>fast digest Buffer</i> | C/TCGAG | Thermo Scientific |

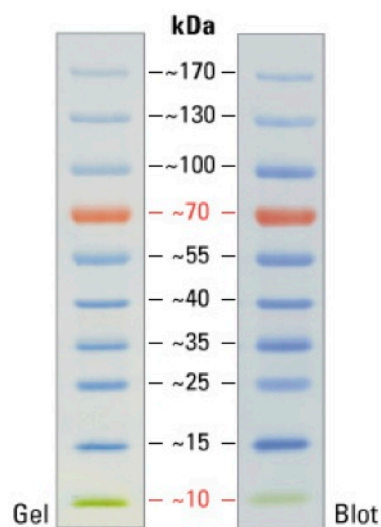
3.1.5 Größenstandards

| Produktbezeichnung | Firma |
|---------------------------------------|--------------------|
| 1 kb <i>DNA Ladder</i> | life technologies™ |
| Native Mark™ Protein Standard | life technologies™ |
| Page Ruler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific |

1 Kb Plus
DNA Ladder



Page Ruler
Prestained Proteinladder



Native Mark Protein
Standard

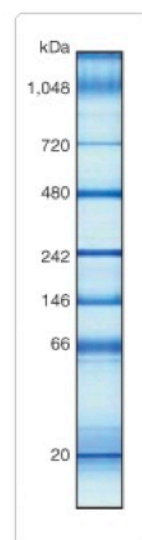


Abbildung 5: Größenstandards

Größenstandards für Gelelektrophoresen für DNS und Proteine (Quelle: Thermo Fisher Scientific)

3.1.6 Bakterienstämme

| Produktbezeichnung | Firma |
|---------------------------------|--------------------|
| DH5α <i>competent cells</i> | life technologies™ |
| XL1-Blue <i>competent cells</i> | life technologies™ |

3.1.7 Eukaryote Zelllinien

| Produktbezeichnung | Firma |
|---|-------|
| COS-7 Zellen (<i>monkey kidney cells</i>) | DSM-2 |

3.1.8 Vektoren

| Vektor | Größe | Resistenz | Firma |
|--------------|---------|------------|---------------------|
| pDONR 221 | 4762 bp | Kanamycin | life technologies™ |
| pEF-DEST51 | 7464 bp | Ampicillin | life technologies™ |
| pMal-c2e | 6629 bp | Ampicillin | New England Biolabs |
| pMalc2x-DEST | 8358 bp | Ampicillin | New England Biolabs |

3.1.9 Puffer und Medien

Puffer und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Puffer wurden filtriert und entgast. Medien wurden autoklaviert.

| Puffer | Firma |
|--|------------------------------|
| Dulbeccos's PBS (1x), ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} | PAA Laboratories |
| MOPS SDS <i>running buffer</i> NuPAGE® (20x) | novex® by life technologies™ |
| NativePAGE™ 20x <i>Cathode Buffer Additive</i> | life technologies™ |
| NativePAGE™ 20x <i>Running Buffer</i> | life technologies™ |
| TBE-Puffer (10x) | Serva |

| Puffer/Medium | Zusammensetzung |
|------------------------------|--|
| Amaza Puffer | 236,15 M Calciumnitrat, 74,55 M Kaliumchlorid, 246,5 M Magnesiumsulfat, 58,44 M Natriumchlorid, 84,01 M Natriumhydrogencarbonat, 177,99 M Natriumhydrogenphosphat, 180,2 M Glucose, 260,29 M HEPES, 307,33 M Glutathion, pH 7,3 einstellen |
| Anodenpuffer I | 25 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4 einstellen |
| Anodenpuffer II | 300 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4 einstellen |
| Entfärber Lösung | 25 % (v/v) Methanol; 8 % (v/v) Essigsäure (100 %) |
| Fixationslösung | 40 % Methanol; 8 % Essigsäure (100 %) |
| <i>Size-Exclusion-Puffer</i> | 20 mM HEPES Natriumsalz, 200 mM NaCl, pH 7,0 einstellen |

| | |
|--------------------------------|--|
| HPLC-Puffer | 1,57 % (v/v) NH ₃ , 2 % (v/v) Essigsäure (100 %) pH 4,6 einstellen |
| Kathodenpuffer | 25 mM Tris-HCl, 40 mM Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4 einstellen |
| LB-Medium | 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5 einstellen |
| LB-Festagarplatten | 2 % (w/v) Agar in LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin |
| Lysepuffer | 20 mM Tris-HCL, 200 mM NaCl, 1 Tablette Complete-Mini |
| Lysepuffer II | 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 Tablette Complete-Mini, 0,5 % Triton |
| Maltosepuffer (Elutionspuffer) | 10 mM Maltose in Säulenpuffer (s.u.) |
| MOPS-Puffer | 5 % (v/v) MOPS SDS running buffer NuPAGE® (20x) |
| Milch 5% | 1x TBS-Puffer (s.u.), 5 % Milchpulver (w/v) |
| Na/HEPES-Puffer | 22,35 mM HEPES Natriumsalz, pH 7,3 einstellen |
| Säulenpuffer | 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl |
| TBE-Puffer | 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (0,5 %), pH zwischen 8,1-8,5 einstellen |
| 1xTBS Puffer mit 0,05% Tween | 10 % (v/v) 10x TBS-Puffer, 0,05 % (v/v) Tween |
| 10xTBS-Puffer | 6,05 % (m/v) Tris (hydroxylmethyl-aminomethane), 8,76 % (m/v) Sodium Chloride |

| Medium | Firma | Zusätze |
|---------------------------------------|------------------|--|
| RPMI 1640 <i>with stable</i> Glutamin | PAA Laboratories | 10 % FCS (Gibco® by life technologies™) 1 % Antibiotic/ Antimycotic (PAA Laboratories) |

3.1.10 Geräte

| Produktbezeichnung | Firma |
|--------------------------------|---------------|
| Agarosegelelektrophoresekammer | MWG-Biotech |
| ÄKTA-Purifier mit Frac950 | GE Healthcare |
| ÄKTAexpress | GE Healthcare |
| Amaya | biosystems |

| | |
|--|---------------------------|
| Centrifuge 5417R | Eppendorf |
| Centrifuge J2-21 | Beckman Coulter |
| CO2 Inkubator C200 | Labotect |
| Diana (CCD-Kamera) | raytest |
| Digital Sonifier® | Branson |
| Easypet® Pipettierhilfe, 0,1-100 ml | Eppendorf |
| Einkanalpipetten Research® | Eppendorf |
| Excella E24R Incubator Shaker | New Brunswick Scientific |
| FluoStar Optima Microplate Reader | BMG Labtech |
| Gel Jet Imager, Multi-Dark Box | Intas |
| Heizblock | Liebisch |
| HPLC Ultimate 3000 | Dionex |
| Mastercycler personal | Eppendorf |
| Multipipette, Dispenser, 1-2000 µl | Eppendorf |
| NanoDrop ND-1000 | Peqlab Biotechnology GmbH |
| Perfect Blue™ `Semi-Dry`-Elektroblotter | Peqlab Biotechnology GmbH |
| Präzisionswaage | Sartorius |
| PTC-100 Programmable Thermal Controller | MJ Research Inc. |
| Rotixa/KS Zentrifuge | Hettich |
| Spannungsgeber PS1006 | Apelex |
| Ultrospec 3100 pro, UV/Visible Spectrophotometer | Biochrom |
| Uniflow KR-130 Biohazard | Uni Equipe |
| Universal 16R Zentrifuge | Hettich |
| Vortex Genie 2 | Bender & Hobein AG |
| Waage, max. 820 g | Sartorius |
| Wasserbad | GFL |
| Wasserbad Julabo U3 | Liebl & Ritzinger |
| XCell Surelock, Gelelektrophoresekammer | Invitrogen |

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

| Produktbezeichnung | Firma |
|--|------------------|
| Centrifugal filter Units Amicon® Ultra | Millipore |
| 50 ml <i>Centrifuge</i> Tube | Sarstedt |
| Einmalspritzen BD Discardit™ II | Becton Dickinson |
| ep Dualfilter T.I.P.S.® | Eppendorf |
| Filtropurs 0,45 µm, Spritzenvorsatzfilter | Sarstedt |
| Microtest <i>Plate</i> 96-well <i>flat bottom</i> | Sarstedt |
| <i>Microtube</i> 1,5 ml | Sarstedt |
| Optiplate 96F <i>black</i> , 96-well <i>Microplate</i> | Perkin Elmer |
| PCR- <i>Tube</i> 0,2 ml | Eppendorf |
| Petrischale, Ø 90 mm | Carl Roth GmbH |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Serologische Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Sarstedt |
| <i>Tissue Culture Flask</i> , 75 und 25 cm² | Sarstedt |
| Tube, 15 ml und 50 ml | Sarstedt |

3.1.12 Software

| Software | Webseite/ Hersteller |
|-----------------|----------------------|
| Chromeleon | Dionex |
| Image J | Imagej.nih.gov |
| Graph Prism 5.0 | Graphpad.com |

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Gezielte Mutagenese (*Site-Directed-Mutagenesis*, SDM)

Spezifische Punktmutationen innerhalb des *PAH*-Gens wurden durch ortsspezifische Mutagenese (*engl.: Site-Directed-Mutagenesis*, SDM) erstellt. Die gewünschten Mutationen wurden mittels spezifischer Primer und anschließender Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (*engl.: Polymerase Chain Reaction*, PCR) eingefügt.

Primer-Design

Die für SDM verwendeten Primer sollten folgende Eigenschaften aufweisen (Eurofins Genomics): eine Länge zwischen 25 und 45 Basen, eine Schmelztemperatur > 78 °C, mindestens 40 % G/C- Gehalt und sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende ein G/C. Weiterhin sollte der gewünschte Basenaustausch in der Mitte der Primer liegen und von 10-15 Basen korrekter, komplementärer Matrizensequenz flankiert werden.

Drei Mutationen wurden in dieser Arbeit generiert. Die spezifischen Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Primerdesign

| Mutation auf Basenebene | Mutation auf Aminosäurenebene | Primer <i>forward</i> | Primer <i>reverse</i> |
|-------------------------|-------------------------------|---|--|
| c.754C>T | p.Arg252Trp | 5'- gctggcctgcttcctcttggga ttcttg-3' | 5'- ccaagaaatccaagagga aagcaggccagc-3' |
| c.838G>A | p.Glu280Lys | 5'- cccatgtataccccaacct gacatctgcc-3' | 5'- ggcagatgtcaggttgggggt atacatggg-3' |
| c.1045T>C | p.Ser349Pro | 5'- ggtgctgggctcctgccatcctt tggtgaat-3' | 5'- attcaccaaaggatggcagg agcccagacc-3' |

Polymerase-Kettenreaktion

DNS humaner WT-PAH wurde von imaGenes (EST clone RZPD) bezogen und anschließend nach den Herstellerangaben von Gateway®-Technology in den Vektor pDONR 221 kloniert. Der verwendete pENTR Klon fungierte als Matrize. Im ersten Schritt der PCR-Reaktion wurde die doppelsträngige Matrize mittels Hitze aufgetrennt

(95 °C bzw 98 °C, initiale Denaturierung). Die spezifischen Primer wurden bei einer definierten Temperatur am komplementären Strang hybridisiert (*Annealing*) und anschließend amplifiziert (Elongation). Die Nukleotid-Basenpaarungen erfolgten nach *Watson-Crick* bis auf die gewünschte Stelle an der ein *missmatch* entstand. Die Elongationszeit richtete sich nach Länge des Plasmids und der Geschwindigkeit der Polymerase (15 sec/kb). Um den Ertrag zu erhöhen, wurde, wie in den Herstellerangaben empfohlen, 60 sec/kb gewählt. Das erwartete PCR-Produkt hat eine Länge von 3915 bp. Somit wurden für die Elongation 4 Minuten gewählt. Insgesamt wurden 12 Zyklen im Mastercycler durchgeführt (Tabelle 3: Programmierung eines Zyklus des Mastercyclers).

Tabelle 3: PCR-Programm

| Temperatur | Zeit (t) | Phase |
|------------|----------|--|
| 95°C | 5 min | Initiale Denaturierung |
| 98°C | 20 sec | Denaturierung und Aktivierung der Polymerase |
| 59°C | 1 min | <i>Annealing</i> |
| 72°C | 4 min | Elongation |
| 72°C | 5 min | Finale Elongation |

Unter Verwendung des KAPAHiFi™ Hot Start PCR Kit wurden die folgenden PCR-Reaktionen durchgeführt. Betain und Magnesium sollten zusätzlich die DNS-Amplifikation unterstützen.

Ansatz 1

- 33 µl Aqua bidest. (Nuklease-frei)
- 1 µl MgCl₂ (25mM)
- 1,3 µl *Forward*-Primer (10 µM)
- 1,3 µl *Reverse*-Primer (10 µM)
- 1,5 µl KAPA dNTP Mix (10 mM jedes dNTP)
- 10 µl 5 x KAPAHiFi™ GC *Buffer* mit MgCl₂ (10mM Mg²⁺)
- 1 µl DNS Matrize (50 ng/µl)
- 1 µl DNS-Polymerase (1U/µl)

Ansatz 2

- 33 µl Aqua bidest. (Nuklease-frei)
- 1 µl Betain (50 mM)
- 1,3 µl *Forward-Primer* (10 µM)
- 1,3 µl *Reverse-Primer* (10 µM)
- 1,5 µl KAPA dNTP Mix (10 mM jedes dNTP)
- 10 µl 5 x KAPAHiFi™ GC *Buffer* mit MgCl₂ (10 mM Mg²⁺)
- 1 µl DNS Matrize (50 ng/µl)
- 1 µl DNS-Polymerase (1 U/µl)

Alle Schritte erfolgten auf Eis.

DpnI-Verdau

Für den Abbau der *Template*-DNS (WT-PAH in pDONR 221), wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* angesetzt. *DpnI* schneidet methylierte DNS und somit im Reaktionsansatz nur die *Template*-DNS.

Für die Ansätze wurde folgendes pipettiert:

- 45 µl PCR-Produkt
- 1 µl *DpnI fast digest* (10 u/µl)
- 5 µl *fast digest* Puffer

Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 80 °C für 5 min. Anschließend wurde das PCR-Produkt in *E.coli* (XL-1-*Blue*-Zellen) transformiert (s. 3.2.2.1). Der Erfolg der Mutagenese PCR wurde nach Isolation der DNS (s. 3.2.1.3) durch Sequenzierung des Plasmids (durch Eurofins Genomics) nachgewiesen.

3.2.1.2 Ligation mit der LR-Rekombinationsreaktion (Gateway®-Technologie)

Die Gateway®-Technologie liefert einen schnellen und hocheffizienten Weg, DNS-Sequenzen in multiple Vektorsysteme zu transferieren. Es ist ein auf λ-Bakteriophagen basierendes *site*-spezifisches Rekombinationssystem mit spezifischen *attachment-sites* (*att-sites*), die die Integration des gewünschten Gens in *E.coli* Chromosomen vereinfachen. Der Transfer heterologer DNS-Sequenzen zwischen Vektoren wurde in zwei Schritten, der BP-Reaktion und der LR-Reaktion durchgeführt. In diesem Kapitel wird die LR-Reaktion beschrieben. Die LR-Reaktion wird durch einen Enzym-Mix

katalysiert, der die spezifischen Sequenzen (*att-sites*) verbindet und DNS kovalent bindet. Der Enzym-Mix beinhaltet folgende Enzyme: λ -Bakteriophagen Rekombinationsproteine: Integrase und Excisionase, ein *E.coli*-codiertes Protein: *Integration-Host-Faktor* und entsprechende Reaktionspuffer. Das Reaktionsschema wird in Abbildung 6 dargestellt.

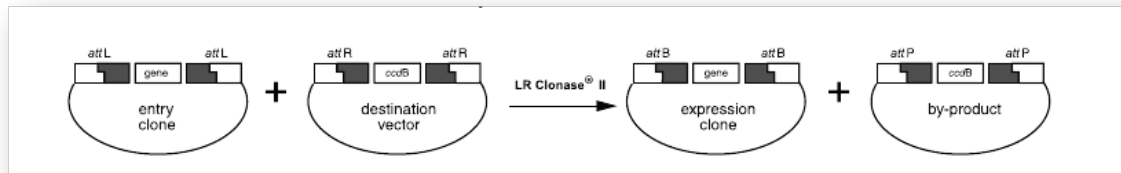


Abbildung 6: LR-Reaktion

Die *att-sites* des *Entry*-Klons (*att-L*) konnten durch die LR-Klonase II an den Destinationsvektor (*att-R*) gebunden und rekombinant werden. Das Produkt, der Expressionsklon, besteht aus Destinationsvektor und eingefügtem Gen. Das Beiprodukt wird durch das eingesetzte Selbstmordgen *ccdB* zerstört.

Quelle: Gateway® Technology with Clonase® II Protocol, invitrogen™ by life technologies™

In dieser Arbeit wurden *Entry*-Klone mit C-terminalem Stop-Codon zur Generierung prokaryoter Expressionskonstrukte mit einem N-terminalem Maltose-bindenden Protein eingesetzt (verwendeter Vektor: pMalc2x-DEST). Die *Entry*-Klone zur Herstellung eukaryoter Expressionskonstrukte wurden mit C-terminalem V5-Tag eingesetzt (verwendeter Vektor: pEF-DEST 51-V5).

Ansätze der LR-Reaktion wurden wie folgt pipettiert:

150 ng/μl DNS-Plasmid (*Entry*-Klon)

1 μl Vektor (150 ng/μl) (pMalx2c-DEST bzw. pEF-DEST 51-V5)

1 μl LR-Klonase

Auffüllen der Probe auf 5 μl mit Nuklease-freiem Wasser

Die Proben wurden zwei Stunden bei 25 °C inkubiert. Um die Klonase zu deaktivieren, wurde 1 μl Proteinase K hinzugefügt und für weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Proteinase K schneidet Enzyme unspezifisch, so dass sie nicht mehr funktionsfähig sind. Das Produkt wurde dann in DH5α-Zellen transformiert. Die ausgewählten Zielvektoren (pMalc2x-DEST bzw. pEF-DEST 51-V5) tragen eine andere Antibiotikaresistenz als der *Entry*-Klon (PAH-Gen in pDONR221), was eine Selektion möglich macht. Unter Verwendung von Antibiotika wachsen somit bei Anzucht transformierter DH5α-Zellen nur Bakterienkolonien, bei denen die LR-Reaktion erfolgreich war. Positive Klone wurden durch einen Restriktionsverdau (s. 3.2.1.5) kontrolliert.

3.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterienzellen

Je nach Volumen der Bakterienkultur, die für die Isolation der DNS bereitgestellt wurde, erfolgte entweder eine Minipräparation (5 ml) oder eine Maxipräparation (300 ml).

Mini-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNS aus 5 ml Bakterienkultur

Ein Klon transformierter Bakterien wurde 16 h in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Antibiotikum (100 µg/ml) (Kanamycin: bei pDONR 221 in XL-1 *Blue*-Zellen bzw. Ampicillin: bei pMalc2x-DEST bzw. pEF-DEST 51-V5 in DH5- α -Zellen) bei 37 °C, 200 rpm kultiviert. Die Kultur wurde 15 min bei 4600 rpm, und 4 °C zentrifugiert. Für die Präparation wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* verwendet. Kurz zusammengefasst wurde das *E.coli*-Zellpellet suspendiert, alkalisch lysiert und ausgefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und entfernt, so dass der Überstand auf eine Silikanmembran aufgetragen werden konnte. Die DNS wurde von der Membran gebunden und konnte in einem weiteren Schritt gereinigt werden. Die isolierte Plasmid-DNS wurde mit 30-50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

Maxi-Präparation: Isolierung von Plasmid-DNS aus >100 ml Bakterienkultur

Ein Klon transformierter Bakterien oder Bakterien eines Glycerinstocks wurden in 2 ml LB-Medium mit 2 µl Ampicillin (100 µg/ml) kultiviert. Nach 8 h (37 °C, 200 rpm) Schüttler wurden 800 µl der Vorkultur in 300 ml LB-Medium mit 300 µl Ampicillin (1 mg/ml) 16 h bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Die Maxipräparation erfolgte mit dem Pure Yield™ Plasmid Maxi-prep System, die Herstellerangaben wurden genau befolgt. Für die Zellernte wurde die Kultur 10 min bei 5000 x g, Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 17 ml Resuspensions-Lösung suspendiert. Weiterhin wurden die Zellen in 17 ml Lyse-Lösung bei RT 10 min inkubiert und lysiert. Nach Zugabe von 19 ml Neutralisationsmischung und 5 min Inkubation bei RT, wurde 15 min bei 17000 x g, RT zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte mittels Vakuumpumpe. Die DNS wurde gereinigt und mit 800 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

3.2.1.4 Bestimmung der DNS-Konzentration

Zur Bestimmung der DNS-Konzentration sowie der Reinheit der DNS-Lösungen wurde der NanoDrop ND 1000 (PepLab) verwendet. Die Absorption von DNS-Lösungen

wurde bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Hier entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm errechnet. Der Wert eines reinen Produkts liegt ungefähr bei 1,8.

3.2.1.5 DNS-Restriktion mit Endonukleasen

Restriktionsenzyme binden an spezifische Erkennungssequenzen und spalten doppelsträngige DNS. Durch den Einsatz von Endonukleasen konnte isolierte DNS an spezifischen Schnittstellen fragmentiert werden. Die DNS-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung anhand ihrer Größe (bp) zugeordnet.

Folgende Ansätze wurden pipettiert:

Für Expressionsklone im Vektor pMalc2x-DEST:

4 µl DNS
 4,2 µl dH₂O
 0,8 µl *Bgl*II Restriktionsenzym
 1 µl *Bgl*II Buffer

Für Expressionsklone im Vektor pEF-DEST 51-V5:

4 µl DNS
 4,2 µl dH₂O
 0,8 µl *Xho*I *fast digest* Restriktionsenzym
 1 µl *fast digest* Puffer

Zusätzlich wurde eine Probe mit dem jeweiligen Vektor (Kontrolle) einem Verdau unterzogen. Nach 1,5 h Inkubation bei 37 °C wurde 1 µl *Gel-Loading Buffer* hinzugefügt. Bei Einsatz von *fast digest* Enzymen wurde lediglich 15 min inkubiert.

Tabelle 4: DNS-Fragmentgröße nach Restriktionsverdau

| Restriktionsenzym | Vektor | Größe der DNS-Fragmente | Größe der Fragmente des Leervektors |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| <i>Bgl</i> II | PAH in pMalc2x-DEST | 1130 bp und 6953 bp | 1710 bp und 6648 bp |
| <i>Xho</i> I | PAH in pEF-DEST 51-V5 | 830 bp und 6341 bp | 7464 bp |

Die erwarteten Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

3.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Produktkontrolle von PCR- und LR-Produkten, als auch des Restriktionsverdau, eingesetzt. DNS-Fragmente wurden nach ihrer Größe beurteilt und Rückschlüsse auf die Richtigkeit des Produkts getroffen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 1 % Agarosegel. Zur Detektion der Fragmente wurde Ethidiumbromid verwendet. Je 5 µl PCR- bzw. 10 µl LR-Produkt mit je 1 µl *Gel Loading Buffer* (10 x) wurden auf das Gel aufgetragen. Eine 1 kb Plus *DNA Ladder* wurde dabei als Größenstandard eingesetzt. Die Trennung der Fragmente erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Spannung von 120 V. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNS-Fragmente wird durch deren Ladung und somit durch die Fragmentgröße bestimmt. Die Detektion der DNS-Fragmente erfolgte anschließend mit einem UV-Transluminator.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Transformation bezeichnet den Vorgang des Einschleusens von Fremd-DNS in Bakterien. Um die Aufnahme der DNS durch die Zellwand zu ermöglichen, wurden die Bakterien einem sogenannten Hitzeschock ausgesetzt und die Poren zum Durchtritt geöffnet. Für den Einsatz des PCR-Produkts wurden superkompetente XL-1 *Blue*-Zellen verwendet. Diese können die, bei der PCR entstandenen, Einzelstrangbrüche des zirkulären Plasmids verschließen und einen geschlossenen Vektor bilden. Für den Einsatz des LR-Produkts wurden kompetente DH5α-Zellen verwendet. Je 50 µl Zellen und 5 µl PCR-Produkt bzw. 2 µl LR-Produkt wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurden die Proben bei 42 °C für 45 sec (XL-1 *Blue*-Zellen) bzw. 90 sec (DH5α-Zellen) im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium wurden die Proben bei 37 °C für 1 h auf den Schüttelinkubator (225 U/min) gestellt. Daraufhin wurden die transformierten Bakterien, wie in 3.2.2.2 beschrieben, auf Agarplatten kultiviert.

3.2.2.2 Anzucht transformierter *E.coli*-Zellen auf Agarplatten und in flüssigem Medium

Positiv transformierte Bakterien besitzen, durch das eingesetzte Plasmid, eine Antibiotikaresistenz. Auf mit entsprechendem Antibiotikum versetztem Nährmedium wachsen damit nur erfolgreich transformierte Bakterien. Für die Isolation positiver Klone wurden Suspensionen transformierter Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (30 µg/ml Kanamycin bei Konstrukten in pDONR 221 bzw. 100 µg/ml Ampicillin bei Konstrukten in pMalc2x-DEST oder pEF-DEST 51-V5) ausplattiert. Die Bakterien wurden bei 37 °C für 16 h inkubiert. Nachfolgend wurde flüssiges LB-Medium (5 ml), mit entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einem positiven *E.coli*-Klon beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (200 rpm) über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden die Kulturen bei 4000 rpm, 15 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das *E.coli*-Zellpellet mittels Mini-Präparation (s. 3.2.1.3.1) aufbereitet und bei -20 °C eingefroren.

3.2.2.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die Zunahme der optischen Dichte in Bakterienkulturen wurde durch die Messung der Absorption (Wellenlänge 600 nm) im Spektralphotometer bestimmt. War diese im Vergleich zum Leerwert (*hier*: LB-Medium) erhöht, konnte auf die Höhe der Zellvermehrung geschlossen werden.

3.2.2.4 Herstellung von Glycerinkulturen

Um positiv transformierte *E.coli*-Zellen dauerhaft bei -80 °C lagern zu können, wurden Glycerinkulturen angelegt. Je 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einem positiven Bakterienklon beimpft. Die Zellen wurden kultiviert (16 h, 37 °C, 200 rpm) und geerntet (10 min, 4 °C, 4000 rpm). Die Pellets wurden in 800 µl LB-Medium mit Glycerin (1:1) suspendiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 Proteinbiochemische und analytische Methoden

3.2.3.1 Expressionstests (Kleinskalige Expression)

Zur Überprüfung der Proteinexpression neu generierter varianter PAH in *E.coli* (Konstrukte in pMalc2x-DEST) als auch zur Analyse der Faltungseffizienz der WT-PAH

und varianter PAH, wurde ein kleinskaliger Expressionstest durchgeführt. Fünf ml LB-Medium versehen mit 5 µl Ampicillin (100 µg/ml) wurden mit einer Probe aus Glycerinkulturen beimpft. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht transformierte DH5α-Zellen verwendet. Die Vorkulturen wurden 16 h bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator gezüchtet (220 rpm). Am Folgetag wurden die Hauptkulturen (45 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) mit 450 µl 20 % Glucose-Lösung versehen und mit 450 µl Vorkultur überimpft. Die Hauptkulturen wurden ca. 3 h (37 °C, 220 rpm) kultiviert bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,5-0,6 erreicht wurde. Vor der Induktion der PAH wurde eine Nullprobe der WT-PAH-Kultur abgenommen (5 ml), zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und das gewonnene *E.coli*-Pellet bei -20 °C eingefroren. Die Kulturen wurden nun auf je zwei Falcon-Röhrchen aufgeteilt (20 ml pro 50 ml Falcon-Röhrchen), um Expressionstests bei zwei verschiedenen Postinkubationstemperaturen durchführen zu können (20 °C und 28 °C). Für die Induktion der Genexpression wurde 0,3 mM (finale Konzentration) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), ein künstlicher Induktor des Lactose-operons in *E.coli*, verwendet. Parallel zur Induktion durch IPTG wurden die Kulturen mit Eisen (0,4 M finale Konzentration) angereichert. Es folgte eine Inkubation für 4 h bzw. 21 h (Postinduktionstemperatur: 28 °C) bzw. 21 h (Postinduktionstemperatur 20 °C) auf dem Schüttelinkubator (220 rpm). Fünf ml der Kulturen wurden zentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 10 min), der Überhang verworfen und die Pellets bei -20 °C eingelagert. Am nächsten Tag wurden die Pellets in 500 µl Säulenpuffer resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte jederzeit auf Eis. Anschließend wurde jede Probe jeweils dreimal am Digital Sonifier[®] beschallt. Pro Durchgang wurde 15 sec bei einer Amplitude von 10 % (Pulse: 0,8 sec; Pause: 0,2 sec) sonifiziert. Zwischen jedem Durchgang wurde 1 min pausiert, so dass die Proben wieder abkühlten. Daraufhin wurde zentrifugiert: 14000 rpm bei 4 °C für 20 min. Der Überstand, der das lösliche Protein enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und das Pellet (unlösliche Fraktion der PAH Proteine) in 500 µl Säulenpuffer gelöst. Die Analyse der Proteinexpression und –Faltung erfolgte durch SDS-PAGE. Die Proben wurden wie folgt pipettiert:

8 µl des resuspendierten Pellets bzw. des löslichen Überstands

28 µl (2 x) LDS Probenpuffer

4 µl *sample reducing agent*

Es folgte die Denaturierung bei 95 °C für 5 min.

Je 10 µl der Gelproben wurden auf ein 10 % SDS-Gel (1,5 h bei 200 V) aufgetragen. Zusätzlich wurde als Referenz 4 µl *Page Prestained Protein Ladder* pipettiert.

3.2.3.2 Proteinexpression von WT-PAH und von 13 PAH-Varianten in *E. coli*

Für eine ausreichende Proteinausbeute nach der Proteinreinigung sollten größere Proteinmengen exprimiert werden. Hierfür wurden zunächst 30 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt und mit einer Probe aus Glycerinkulturen beimpft. Die Vorkulturen wurden bei 37 °C, 220 rpm für 16 h inkubiert.

Für 2 L Hauptkultur wurde folgendes vermengt und bei 37 °C inkubiert:

- 15 ml der Vorkultur
- 1 l LB-Medium
- 1 ml Ampicillin
- 10 ml 20 %-Glucose-Lösung

Nach ca. 3 h wurde die optische Dichte OD₆₀₀ 0,5-0,6 erreicht. Es erfolgte die Induktion der Genexpression mit 0,3 mM IPTG-Lösung und 0,4 M Eisen. Die Hauptkulturen wurden nun bei 28 °C, 16 h und 220 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen bei 5000 x g, 4 °C für 25 min zentrifugiert und die so entstandenen Pellets in 10 ml PBS-Puffer suspendiert und nochmals bei 4 °C, 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bis zum Tag der Proteinreinigung bei -20 °C eingefroren. Für die Entfernung der Bakterienhüllen wurden die Zellpellets der Bakterienkulturen in je 15 ml Säulenpuffer mit einer Tablette *Complete-Mini* (Protease-Inhibitor-Mix) resuspendiert. Alle Schritte erfolgten auf einer Mixtur aus Eis und Ethanol (80 %). Die Bakterienzellen wurden insgesamt viermal bei einer Amplitude von 70 % für 45 sec (Pulse: 0,8 sec / Pause: 0,2 sec) beschallt. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurden die Proben zwischendurch jeweils 1 min gekühlt. Die sonifizierten Proben wurden 20 min bei 15000 x g, 4 °C zentrifugiert. Die Proteine befanden sich im Überstand, Zellmembranbestandteile sammelten sich im Pellet und wurden verworfen. Das lösliche Produkt (das sogenannte Zellrohllysate) wurde durch einen 45 µm Filteraufsatz filtriert. Je 2 µl des Zellrohllysats wurden als SDS-Gelproben vorbereitet, um nach der Proteinreinigung eine Produktkontrolle vornehmen zu können.

Für die Gelproben wurde folgendes pipettiert und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert:

- 2 µl Zellrohllysate
- 14 µl *Size-Exclusion-Buffer*
- 4 µl *sample reducing agent*
- 20 µl (2 x) LDS

3.2.3.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein Trennverfahren, das Zielproteine durch Bindung eines Liganden (Bindungsprotein) isoliert. In diesem Fall wurden die rekombinanten Proteine mit einem Maltose-bindenden Proteins (MBP)-*Tag* fusioniert. Diese Markierung ermöglicht die Reinigung durch Affinitätschromatographie und erhöht das Expressionslevel sowie die Löslichkeit des Proteins. Dadurch kann eine Akkumulation der Proteine in einer unlöslichen Form verhindert werden. Um die WT-PAH bzw. die variante PAH aus der *E.coli*-Protein-Suspension zu isolieren, wurde das Zellrohlysat zunächst auf eine MBPTrap™ Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Die Säule adsorbierte die Proteine am Maltose-bindenden Protein. Die markierten Proteine wurden nun mithilfe von Säulenpuffer, der mit einer hohen Konzentration von Maltose versetzt war (10 mM), eluiert. Das entstandene Rohextrakt wurde auf einen Größenausschlusschromatographen aufgetragen (s. 3.2.3.4).

3.2.3.4 Größenausschlusschromatographie

Die durch Affinitätschromatographie isolierten Fusionsproteine wurden in einem weiteren Reinigungsschritt auf einen Größenausschlusschromatographen aufgetragen. Hier erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die Proteine wurden in Fraktionen aufgefangen, wobei größere Moleküle zuerst eluierten, da kleinere durch Poren in der Säulenmatrix zurückgehalten wurden (Abbildung 7).

In diesem experimentellen Aufbau wurde die Gelfiltrationssäule mit *Size-Exclusion*-Puffer equilibriert. Während des Durchgangs wurde, wie oben beschrieben, ein Chromatogramm erstellt, das durch Absorptionsmessungen (280 nm) die Konzentration der Fraktionen darstellte. Zunächst eluierten die großen Proteinaggregate, gefolgt von tetrameren Proteinen und zuletzt Dimeren. Fraktionen mit Tetramer-Proteinen wurden vereinigt und aufkonzentriert. Dafür wurden sie in einen mit *Size-Exclusion*-Puffer equilibrierten Zentrifugal-Filter überführt und bei 4 °C, 2500 rpm für 40 min zentrifugiert. PAH-Tetramere konnten die Poren (bis 30.000 Dalton) nicht passieren und sammelten sich im Filter. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der gesammelten PAH-Tetramere am Spektrophotometer ermittelt (s. 3.2.3.6.2). Die gereinigten Fusionsproteine wurden auf Kryoröhrchen aliquotiert und bei -196 °C in Stickstoff gelagert. Um die Expression und die Reinheit

der rekombinanten MBP-PAH Proteine zu kontrollieren, wurden SDS-Gelproben erstellt. Folgendes wurde pipettiert und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert:

- 1 mg/ml PAH-Protein
- 4 µl *sample reducing agent*,
- 20 µl (2 x) LDS

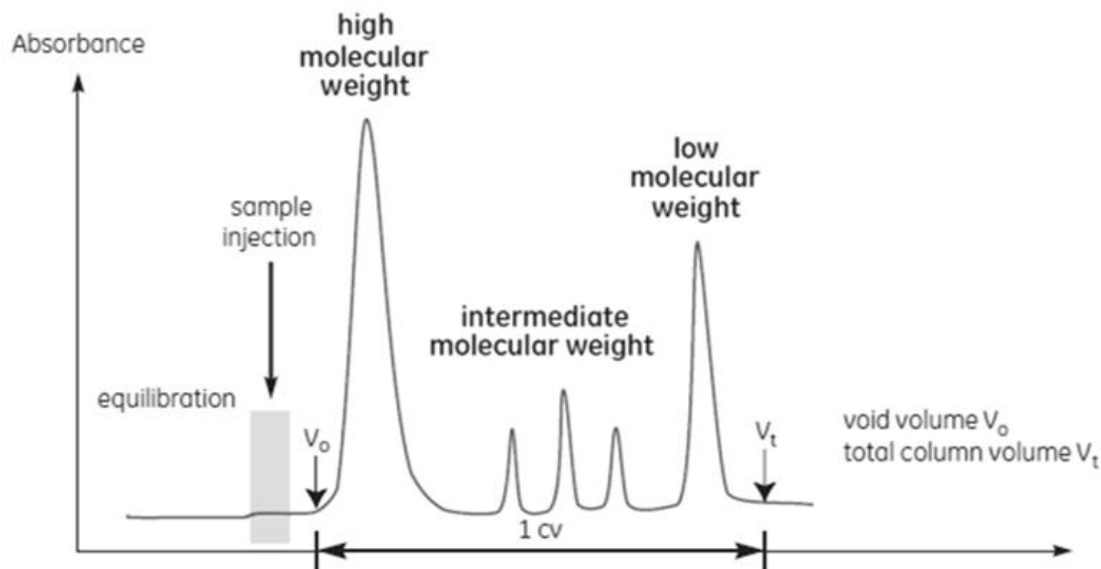


Abbildung 7: Theoretische Darstellung eines Größenausschlusschromatogramms

Größenausschlusschromatographie separiert Moleküle nach ihrer Größe während ihrer Passage durch das SEC (*Size-Exclusion-Chromatography*)-Medium. Zunächst eluieren Moleküle, die nicht von der Matrix erfasst werden, gemeinsam in das Leervolumen (V_0), da sie die Säule mit derselben Geschwindigkeit wie der Laufpuffer passieren. Moleküle mit partiellem Zugang zu den Poren der Matrix verlassen die Säule mit abnehmender Größe. Kleine Moleküle, wie Salze, haben vollen Zugang zu den Poren und bewegen sich an der Säule hinab, aber separieren sich nicht voneinander und eluieren erst kurz vor dem totalen Säulenvolumen (V_t).

Quelle: GE Healthcare, Life Science, „Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods“

3.2.3.5 ÄktaXpress

Die ÄktaXpress ist ein Flüssigkeitschromatographiesystem für automatische, mehrstufige Aufreinigungsprozesse für rekombinant exprimierte Proteine. Sie vereint die Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie zu einem Schritt und erleichtert den Arbeitsprozess. Deshalb wurde die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (s. 3.2.3.3) und die Größenausschlusschromatographie (s. 3.2.3.4) der MBP-markierten PAH auf der ÄktaXpress durchgeführt.

3.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach M. M. Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode, entwickelt von der Biochemikerin Marion M. Bradford. Ein Farbreagenz bindet die Proteine einer Probe und dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum, im Gegensatz zu freiem Farbreagenz, von 470 nm nach 595 nm. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Differenz der Absorptionen des Leerwerts und des proteingebundenen Farbreagenz gemessen. Für jede zu messende Probe wurden je 5 µl Proteinprobe mit 200 µl verdünntem *Protein Assay-Dye Reagent Concentrate* (1:4 verdünnt mit dH₂O) auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Des Weiteren wurden 5 µl BSA-Standards zu je 200 µl verdünntem Bradford-assay pipettiert und ein Leerwert angelegt. Die Messung erfolgte am FluoStar Optima bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.2.3.6.2 Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration (A_{280})

Die Konzentrationsmessung erfolgte am Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde das Lambert-Beersche Gesetz angewendet. Das Gesetz beschreibt die Abschwächung der Intensität der Strahlung, wenn die Strahlung ein Medium durchdringt. Hierbei sind die Konzentration der absorbierenden Substanz und die Dicke der zu durchdringenden Schicht entscheidend. Die Proteinlösung wurde in Quarzküvetten gemessen.

Lambert-Beerisches Gesetz:

$$A=c*d*\epsilon$$

(A: Absorption; c=Konzentration; d=Schichtdicke (*hier* d=1); ϵ =Absorptionskoeffizient (*hier*: für MBP-PAH: 1,63))

3.2.3.7 Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Kontrolle der Faltungseffizienz, Proteinexpression und Reinheit der Proteinproben, die in verschiedenen Stadien der Aufreinigung angefertigt wurden, wurde SDS-PAGE angewendet. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, das Proteinproben elektrophoretisch nach ihrer Größe auftrennt. Die negativ geladenen Proben wandern in einem elektrischen Feld durch eine siebartige Polyacrylamidmatrix in Richtung Anode. Die Maschen des Gels halten größere Moleküle zurück, so dass

sie langsamer migrieren als kleine. Unter Verwendung des Novex[®] NuPAGE[®] SDS-PAGE Gel Systems wurde LDS anstelle von SDS zu den Proteinproben hinzugefügt. Dadurch wurden optimale Bedingungen für die Denaturierung der Proben bei einem leicht alkalischen pH (8,4) geschaffen. Zusätzlich wurden die Disulfidbrücken durch Reduktion des *sample reducing agents* aufgespalten. Die vorbereiteten Proben, sowie ein Größenstandard (*Page-ruler prestained protein ladder*) wurden auf das 4-12 % Bis-Tris-Gel aufgetragen. Die Gel-Kammer enthielt MOPS SDS-running Buffer und wurde für 1 h an 200 V angeschlossen.

3.2.3.8 Coomassie-Färbung

Um die Proteinbanden auf SDS-Gelen zu visualisieren, wurden diese für 30 min in Coomassie Färbe-Lösung gefärbt. Proteine wurden durch den enthaltenen Essig fixiert und von der Farblösung gebunden. Daraufhin wurde das Gel zweimalig in Entfärber-Lösung (10 min) geschwenkt und die nicht-Protein gebundene Farbe wieder entfernt. Das Bild des Gels wurde durch einen Scanner digitalisiert.

3.2.3.9 Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse des Oligomerisierungs-Status von rekombinant exprimierten Proteinen wurde Blue Native-PAGE angewendet. Das hierfür verwendete Coomassie-G250 bindet die Proteine und fördert einerseits ihre Löslichkeit und verhindert Aggregatbildung. Andererseits wird durch Bindung die Ladung der Proteine negativ und die Proben können in Richtung der Anode wandern. Im Gegensatz zu SDS (bzw. LDS) werden die Proben nicht denaturiert, ihre Quartärstruktur bleibt erhalten und kann nachfolgend analysiert werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem siebartigen Polyacrylamidgel können, anhand eines Größenstandards, Tetramere, Dimere, Monomere, Aggregate oder Abspaltung wie zum Beispiel MBP (Maltose-bindendes Protein) unterschieden werden. Für die Elektrophorese wurde NativePAGE Novex Bis-Tris Gele 4-16 % gewählt. Je Konstrukt wurden 10 µg frisch aufgereinigtes Protein und 5 µl *Loading Buffer* pipettiert. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit Anoden- (äußere Kammer) und Kathodenpuffer (innere Kammer) beladen. Die Laufdauer betrug 1 h bei 150 V und 30 min bei 250 V. Für die Färbung wurden die Proteinbanden wurde das Gel zunächst in Fixationslösung zweimalig 10 min inkubiert. Jetzt konnte das Produkt 30 min in Coomassie Färbe-Lösung geschwenkt werden,

gefolgt von 30 min in Entfärber-Lösung. Zum Schutz vor Proteinzerfall wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt.

3.2.3.10 Immunoblotting

Die Quantifizierung der Wildtyp- und varianten PAH-Restproteinmenge der transient transfizierten eukaryoten Zellen erfolgte mittels Immunoblotting. Zuerst wurden die Zellkultur Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für die Übertragung wurde nach den Perfect Blue™ `Semi-Dry`Elektroblotter (peqlab Biotechnologie GmbH) Herstellerangaben verfahren. Gel und Membran wurden bei 300 V, 273 mA für 1,5 h dem elektrischen Feld ausgesetzt. Die Proteinbanden wurden wie folgt immunodetektiert. Freie Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit in dH₂O gelöstem Milchpulver (5 %) blockiert. Nun konnten Antikörper spezifisch an das Zielprotein (PAH) binden. Die Membran wurde vor, zwischen und nach der Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper 3 x 5 min mit TBS-Tween (0,05 %) gewaschen. Zunächst wurde die Membran mit 2 µl verdünntem (1:10.000 in 20 ml Milch (5 %)) primären Antikörper (*mouse anti-PAH Antibody*) 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde der zweite Antikörper (*mouse HRP conjugated*; verdünnt 1:10.000 in 20 ml Milch (5 %)) und ein *anti-actin Antibody* (1:10.000 in 20 ml Milch (5 %)) aufgetragen und für 30 min inkubiert (RT). Daraufhin wurden die Proteinbanden durch Einsatz des *West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo scientific) visualisiert. Das luminol-basierende Chemilumineszenz-Substrat detektiert HRP (*horseradish peroxidase*) des zweiten Antikörpers durch Oxidation des Luminols in Anwesenheit von HRP und Peroxidase. Je 750 µl der Reagenzien (*Stable Peroxidase Solution und Luminol/ Enhancer Solution*) wurden über die Membran getropft und 1 min inkubiert. Nun konnten die Proteinbanden mit Hilfe der CCD-Kamera (Diana) visualisiert. Die Belichtungszeit betrug 1 min.

3.2.3.11 Digitale Quantifizierung von PAH Restproteinmengen mittels Image-J

Die Intensität der varianten PAH-Banden im Vergleich zur WT-PAH-Bande wurden mit dem Softwareprogramm Image-J ins Verhältnis gesetzt. Anschließend konnte die Faltungseffizienz und Expression rekombinanter PAH sowie die Quantifizierung der PAH Restproteinmengen analysiert werden.

3.2.3.12 Endpunktmessung der Enzymaktivität transient exprimierter WT-PAH und varianter PAH

Die Endpunktmessungen der Enzymaktivität von transient exprimierter WT-PAH und varianter PAH wurden mit den löslichen, aus COS-7-Zellen extrahierten, Proteinfractionen durchgeführt. Der Präinkubationspuffer (1,5 mM L-Phe in 22,53 mM HEPES-Puffer) wurde mit einer Katalase und dem Zelllysate durch vortexen und zentrifugieren vermischt. Durch Zugabe des Substrats und 5-minütiger Inkubation bei 25 °C im Wasserbad wurden die Enzyme aktiviert. Nun wurde Eisen hinzugefügt und 1 min inkubiert. Für die Induktion der Enzymreaktion erfolgte die Zugabe von BH₄. Für die Nullproben wurde dH₂O verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 60 min bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Terminierung der Katalyse wurde Essigsäure zugegeben und die Proteine 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und bei -80 °C, bis zur Messung der Tyrosin-Konzentration mittels HPLC, eingefroren (Tabelle 5).

Tabelle 5: Pipettierschema eines PAH activity assays aus eukaryot exprimierter PAH

| Schritt | Substrat | Volumen/ Konzentration | Finale Konzentration |
|-------------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------|
| 1 Vermischen | L-Phe | 67 µl (1,5 mM) | 1 mM |
| | Katalase | 10 µl (20 U/µl) | 2 U/µl |
| | PAH-Protein | 20 µl (0,05 µg/µl) | 1 µg |
| 2 Inkubation: 5 min, 25 °C | | | |
| 3 Hinzufügen | Fe ²⁺ | 1 µl (1 mM) | 10 µM |
| 4 Inkubation: 1 min, RT | | | |
| 5 Hinzufügen | BH ₄ | 2 µl (3,75 mM) | 75 µM |
| Für Nullproben | dH ₂ O | 2 µl | |
| 6 Inkubation 60 min, 25 °C | | | |
| 7 Zugabe | Essigsäure | 1 µl (100 %) | |
| 8 Denaturierung 10 min, 95 °C | | | |

3.2.3.13 Endpunktmessung der Enzymaktivität von in *E.coli* exprimierter PAH

Die Endpunktmessungen der Enzymaktivität der WT-PAH und varianter PAH wurden mit gereinigten Proteinen aus prokaryoter Expression durchgeführt. Die sogenannten

PAH *activity assays* wurden für die WT-PAH sowie für die PAH-Varianten je mit und ohne vorherige Substratinkubation durchgeführt. Wie in 3.2.3.12 beschrieben wurde der Präinkubationspuffer (1,5 mM L-Phe in 22,53 mM HEPES-Puffer) mit einer Katalase und dem PAH-Protein vermischt. Durch Zugabe des Substrats und 5-minütiger Inkubation bei 25 °C im Wasserbad wurden die Enzyme aktiviert. Für Versuche ohne vorangehende Substratinkubation des Enzyms wurde anstelle des Präinkubationspuffers lediglich *Size-Exclusion-Buffer* (HEPES-Puffer) verwendet. Anschließend wurde Eisen hinzugefügt und 1 min inkubiert. Für die Induktion der Enzymreaktion erfolgte die Zugabe von 75 µM BH₄. Für Proben ohne vorherige Substratinkubation wurde L-Phe hinzugefügt. Für die Nullprobe wurde dH₂O verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 1 min inkubiert. Zur Terminierung der Katalyse wurde Essigsäure pipettiert und die Proteine 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und bei -80 °C, bis zur Messung der Tyrosin-Konzentration mittels HPLC, eingefroren (Tabelle 6).

Tabelle 6: Pipettierschema eines PAH *activity assays* aus prokaryot exprimierter PAH

| Schritt | Substrat | Volumen/ Konzentration | Finale Konzentration |
|--------------------------------------|--|---------------------------|-------------------------|
| 1 Vermischen | L-Phe (Proben mit Substratinkubation) | 2 µl (50 mM) | 1 mM |
| Für Nullproben | dH ₂ O (statt BH ₄) | 2 µl | |
| | HEPES-Puffer | 65 µl (22,53 mM) | 15 mM |
| | Katalase | 10 µl (20 U/µl) | 2 U/µl |
| | PAH-Protein | 20 µl (0,05 µg/µl) | 1 µg |
| 2 Inkubation: 5 min, 25 °C | | | |
| 3 Hinzufügen | Fe ²⁺ | 1 µl (1 mM) | 10 µM |
| 4 Inkubation: 1 min, RT | | | |
| 5 Hinzufügen | BH ₄ | 2 µl (3,75 mM) | 75 µM |
| Für Nullproben | dH ₂ O | 2 µl | |
| | L-Phe (Proben ohne Substratinkubation) | 2 µl (50 mM) | 1 mM |
| 6 Inkubation 1 min, RT | | | |
| 7 Zugabe | Essigsäure | 1 µl (100 %) | |
| 8 Denaturierung 10 min, 95 °C | | | |

3.2.3.14 Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Für die Bestimmung der Enzymaktivität der WT-PAH und varianter PAH wurde der Substratumsatz durch Quantifizierung der Produktkonzentration bestimmt.

Das Probenfach der HPLC wurde auf 5 °C gekühlt und das HPLC-System mit 100 % Methanol gereinigt. Die Proben der Endpunktmessungen wurden zunächst bei 20.000 x g, 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine 96-Lochplatte übertragen. Zudem wurden definierte L-Tyr-Konzentrationen, für die Kalibrierung des Systems pipettiert. Mit einem HPLC-Laufpuffer wurden die Standards und Proben zu einer Trennsäule geleitet. Dort wurden die Probenansätze mit Druck durch eine Säule gepresst und damit eine Auftrennung der gelösten Bestandteile ermöglicht. Die Analyse der Bestandteile erfolgte über einen Detektor. Anhand des Absorptionsspektrums von Tyrosin wurden die Wellenlängen wie folgt gewählt: Exzitation bei 275 nm, Emission bei 305 nm. Der Chromatograph wurde über das Software Programm Chromeleon gesteuert. Hiermit wurden auch die Detektionsergebnisse quantifiziert. Die Enzymaktivität wurde als Produktkonzentration pro Zeit und Proteinmenge angegeben: pmol L-Tyr/mg Gesamtprotein x min.

3.2.3.15 Fluoreszenzspektroskopische Enzymaktivitätsmessung rekombinanter Fusionsproteine (MBP-PAH): PAH *activity landscapes*

Die kontinuierliche Endpunktmessung beinhaltete die Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von Kofaktor- und Substratkonzentration. Die Messungen erfolgten am Fluostar optima. Dieser wurde vor jeder Messung mit L-Tyr-Standard-Konzentrationen (3,8 µM, 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM) kalibriert. Weiterhin wurde der Faktor der Fluoreszenzlöschung durch den Kofaktor (BH₄) berechnet. Ein Leerwert wurde durch verschiedene Fluoreszenzintensitäten mit der BH₄-Konzentrationen dividiert und so ein sogenannter *Quenching*-Faktor generiert. Die kontinuierliche Messung der PAH-Aktivität wurde mit prokaryot exprimierten, gereinigten MBP-Fusionsproteinen der WT-PAH und varianter PAH durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität nimmt bei steigender Produktkonzentration zu. Sie wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 275 nm und einer Emissionswellenlänge 305 nm entsprechend des spektralen Charakters von L-Tyr bestimmt. Durch den Fluostar optima wurden zwölf unterschiedliche Substratkonzentrationen (0-4000 µM) bei acht verschiedenen Kofaktor-Konzentrationen (0-500 µM) nach einem Schema auf eine 96-Lochplatte pipettiert und

die Produktkonzentration spektrophotometrisch ermittelt. Somit ergab sich eine Datenmatrix von 8 x 12. Diese Ergebnisse wurden mit dem BH_4 -*Quenching*-Faktor verrechnet und einer nicht-linearen Regressionsanalyse von GraphPad Prism 5.0 unterzogen. Die Datenmatrix der Aktivitätswerte bestand nun aus 12 x 400. Im Folgenden wurden die Werte in die Software *package R* (www.r-projekt.org) übertragen. Um einen weichen Farbübergang der Oberfläche der PAH *activity landscapes* zu erhalten, wurde die Funktion *interp.loss* aus dem Zusatzpaket *tgp* (<http://cran.r-project.org/web/packages/tgp/index.html>) angewendet. Diese Funktion interpoliert zwei Datenpunkte mit Hilfe des *polynomial regression fitting* um eine Funktion zwischen ihnen zu finden. Dies führte zu einem Datenanstieg von 400x400. Die Anwendung der Funktion *image.plot* von *package fields* (<http://cran.r-project.org/web/packages/fields/index.html>) stellte nun eine homogene Oberfläche der Farbübergänge der *landscapes* her.

Um die Berechnungen zu vereinfachen, wurde ein Skript erstellt, das *comma-separated files* akzeptierte. Die Farbauswahl der gemessenen und interpolierten Fluoreszenzintensitätswerte wird hier automatisch gewählt.

3.2.4 Methoden in Zellkultur

Für Analysen im eukaryoten System wurden adhärente Affen-Nierenzellen (COS-7-Zellen) verwendet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 in Gewebekulturflaschen kultiviert. Bei der Arbeit wurden stets sterile Bedingungen mit der Unterstützung eines Laminar Flow geschaffen.

3.2.4.1 COS-7- Zellen kultivieren

Adhärenz COS-7-Zellen wurden bei 37 °C in Gewebekulturflaschen mit RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS und 1 % Antibiotikum-Antimykotikum angereichert und bebrütet. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Eine höhere Dichte würde die Wachstumsbedingungen der Zellen mindern. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit erwärmten PBS gewaschen. Um die Adhärenz zu lösen, wurden die Zellen mit Trypsin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Protease wurde im Folgenden durch Zugabe von Medium inaktiviert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Suspension auf neue Gewebekulturflaschen verteilt und das Medium wurde aufgefüllt.

3.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl bestimmt werden. Es wurde 10 µl Zellsuspension auf den speziellen Objektträger aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Zählkammer verfügt über vier Quadrate, die durch den Abstand des Deckglases vom Objektträger genau 0,1 µl fassen. So konnten die Zellen gezählt und mit der folgenden Formel die Gesamtzellzahl ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahlen der Quadrate} \times 2,5 \times 10^4$$

3.2.4.3 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Mithilfe von Nukleofektion wurde Plasmid-DNS der WT-PAH und varianter PAH in eukaryote Zellen transfiziert. Vor der Transfektion wurden die COS-7-Zellen aus den Gewebekulturflaschen gelöst (s. 3.2.4.1), suspendiert und in 50 ml Röhrchen übertragen. Die Falcon-Röhrchen wurden 5 min bei 200 rcf, RT zentrifugiert. Für jedes Mutationskonstrukt wurden je 4 Mio. COS-7-Zellen mit 4 µg Plasmid-DNS transfiziert und auf zwei Elektroporations-Küvetten aufgeteilt. Zunächst wurde das COS-7-Zellpellet mit speziellem Amaxa-Puffer, mit 100 µl/ 2 Mio. Zellen, suspendiert. Je 2 µg DNS und 100 µl Zellsuspension wurden gut gemischt und in Elektroporations-Küvetten übertragen. Die Nukleofektion wurde mit dem Amaxa-Programm durchgeführt. Der Inhalt der Küvetten wurde in je 900 µl RPMI-Medium suspendiert und die transfizierten Zellen in eine 6-Lochplatte überführt. So wurde pro Loch ein Volumen von je 1 ml Zellsuspension (2 mio Zellen) bebrütet. Das Medium wurde nach 24 h gewechselt. Die Ernte erfolgte nach 48 h.

3.2.4.4 Ernte und Lyse von transfizierten COS-7-Zellen

Für die Proteinextraktion wurde das Medium aus den 6-Lochplatten entfernt und die Zellen mit erwärmten PBS gewaschen. Für die Lösung der adhärenen Zellen wurde Trypsin (1 ml/ Loch) eingesetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Zwei ml RPMI-Medium wurden hinzugefügt, um das Enzym zu inaktivieren und die Zellen zu suspendieren. Danach wurden die Zellsuspensionen in ein Röhrchen überführt und bei 200 x g, RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Zellpellets wurden in je 120 µl Lyse-Puffer suspendiert. Die Zellschalen wurden durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C (15 min) und Auftauen, aufgebrochen. In zwei Zentrifugationsschritten

wurden die Zellbestandteile entfernt (Schritt 1: 600 x g, 4 °C, 10 min; Schritt 2: 20.000 x g, 4 °C, 20 min) und der Überhang, mit den gelösten Proteinen, in Eppendorfgefäße überführt.

Für das lösliche Protein, sowie das Pellet wurden SDS-Gelproben angefertigt.

10 µg lösliches Protein bzw. 2 µg unlösliches Protein (Pellet)

Size-Exclusion-Puffer auf 28 µl aufgefüllt

4 µl *sample reducing agent*

16 µl (2 x) LDS

Die Proben wurden 10 min bei 95 °C denaturiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Erstellung einer DNS-Bibliothek mit 13 Plasmid-Konstrukten für die prokaryote und eukaryote Expression

Es wurden insgesamt 13 *PAH*-missense Mutationen ausgewählt, die über die gesamte Sequenz des *PAH*-Gens verteilt sind und bei etwa 33 % der Patienten weltweit vorliegen (www.pahdb.mcgill.ca). In Tabelle 7 werden der Nukleotid-Austausch im *PAH*-Gen und die entsprechenden Veränderungen der Aminosäuren des Proteins sowie die jeweilig betroffene Domäne und die weltweite Häufigkeit der einzelnen Mutationen aufgeführt.

Tabelle 7: DNS-Bibliothek

| <i>PAH</i> Mutation | Nukleotid-Austausch | Domäne | Vorkommen weltweit [%] |
|---------------------|---------------------|------------------|------------------------|
| p.Phe39Leu | c.117C>G | Regulatorisch | 1,31 |
| p.Leu48Ser | c.143T>C | Regulatorisch | 1,97 |
| p.Ile65Thr | c.194T>C | Regulatorisch | 4,05 |
| p.Arg158Gln | c.473G>A | Katalytisch | 2,71 |
| p.Arg252Trp | c.754C>T | Katalytisch | 2,09 |
| p.Arg261Gln | c.782G>A | Katalytisch | 3,56 |
| p.Glu280Lys | c.838G>A | Katalytisch | 2,15 |
| p.Pro281Leu | c.842C>T | Katalytisch | 2,90 |
| p.Ala300Ser | c.898G>T | Katalytisch | 1,09 |
| p.Ser349Pro | c.1045T>C | Katalytisch | 1,47 |
| p.Val388Met | c.1162G>A | Katalytisch | 1,09 |
| p.Arg408Trp | c.1222C>T | Oligomerisierung | 6,67 |
| p.Tyr414Cys | c.1241A>G | Oligomerisierung | 2,12 |

4.1.1 Analytischer Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese der neu erstellten Konstrukte

Für die Erstellung der DNS-Bibliothek wurden *Entry*-Klone der ausgewählten Mutationen generiert und vervielfältigt. Die Produktkontrolle erfolgte nach einem *DpnI*-Verdau mittels Agarosegelelektrophorese und Detektion der Größe der Plasmide (Beispiel in Abbildung 8 A).

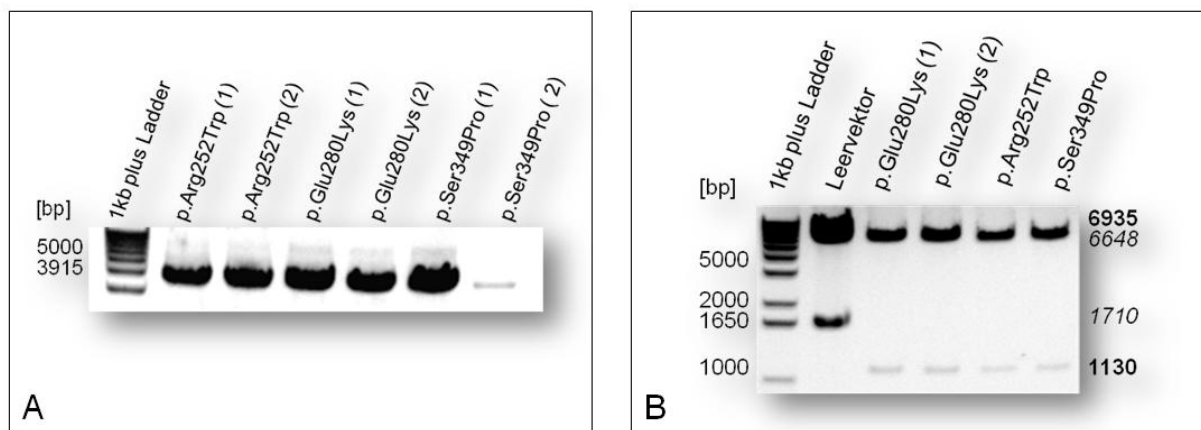


Abbildung 8: Produktkontrolle

(A): Produktkontrolle nach gezielter Mutagenese: 1 % Agarosegel. Banden des verdauten PCR-Produkts wurden auf Höhe von 3915 bp detektiert. Die DNS-Ladder wurde als Referenz eingesetzt. In diesem Beispiel sind je zwei Klone pro Mutation abgebildet. Klon 1 ist ein PCR-Ansatz mit 2,5 mM Mg^{2+} , Klon 2 enthält 1 mM Betain und 2,0 mM Mg^{2+} .

(B): Analytischer Restriktionsverdau von LR-Produkten: 1 % Agarosegel. In diesem Beispiel wurde ein Restriktionsverdau mit *Bgl*III durchgeführt. Als Referenz wurde eine DNS-Ladder (1 kb) eingesetzt. Die Schnittstellen des Leervektors pMalc2x-DEST wurden bei 6648 und 1710 bp detektiert, für die Konstrukte mit eingesetztem *PAH*-Gen bei 6935 und 1130 bp.

Die Plasmid-DNS von LR-Produkten rekombinanter Klonierung für die prokaryote Expression (Vektor: pMalc2X-DEST) und für die transiente Transfektion eukaryoter Zellen (Vektor: pEF DEST-51-V5) wurden nach Transformation in *E.coli*-Zellen isoliert und einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Die *PAH*-DNS-Produkte, eine DNS-Ladder und ein Leervektor ohne Geneinsatz wurden auf Agarose-Gele aufgetragen (Beispiel in Abbildung 8 B). Erfolgreiche Transformanten wurden konserviert und bildeten die Grundlage der DNS-Bibliothek für prokaryote und eukaryote Expression.

4.2 Expression und Aufreinigung des PAH-Wildtyp-Proteins und von PAH-Proteinvarianten aus *E. coli*

Zunächst wurden Expressionstests durchgeführt und die PAH-Proteinmengen detektiert. Die Proteinausbeute der jeweiligen PAH-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp gab Aufschluss über Faltungseffizienz und Stabilität der Enzyme. Des Weiteren wurden *E.coli* Bakterien mit PAH-Geneinsatz für WT-PAH und PAH-Mutationen in großen Mengen kultiviert und die Proteine aufgereinigt. Anhand der Aufreinigungsprofile der PAH-Proteine konnte der Oligomerisierungsstatus und damit die Quatärstruktur der Proteine beurteilt werden.

4.2.1 Analyse der Faltungseffizienz und Stabilität der PAH-Varianten: Expressionstests

Die Analyse der Stabilität und Faltungseffizienz erfolgte durch Messungen der Proteinmenge prokaryot exprimierter, mutierter Phenylalaninhydroxylasen im Vergleich zum Wildtyp in Form von Expressionstests. Die Proteinexpression wurde bei unterschiedlichen Postinduktionstemperaturen (28 °C, 20 °C) durchgeführt. Weiterhin wurde die Expression zeitlich limitiert und nach 4 h bzw. nach 21 h terminiert. Die Proben der Proteinexpression wurden in eine lösliche sowie eine unlösliche Proteinfraction geteilt und die Suspensionen mit LDS versetzt. Dadurch wurde die PAH zu Monomeren bzw. zu tertiärer Faltung degradiert. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels SDS-PAGE. Durch das Molekulargewicht der PAH-Monomere von ca. 52 kDa und das zusätzliche N-terminale Maltose-bindende Protein (43 kDa) konnten die Banden der Fusionsproteine auf Höhe von ca. 95 kDa detektiert und die Proteinmenge gemessen werden. Ein Beispiel für SDS-Gele der Proteinexpression ist in Abbildung 9 dargestellt.

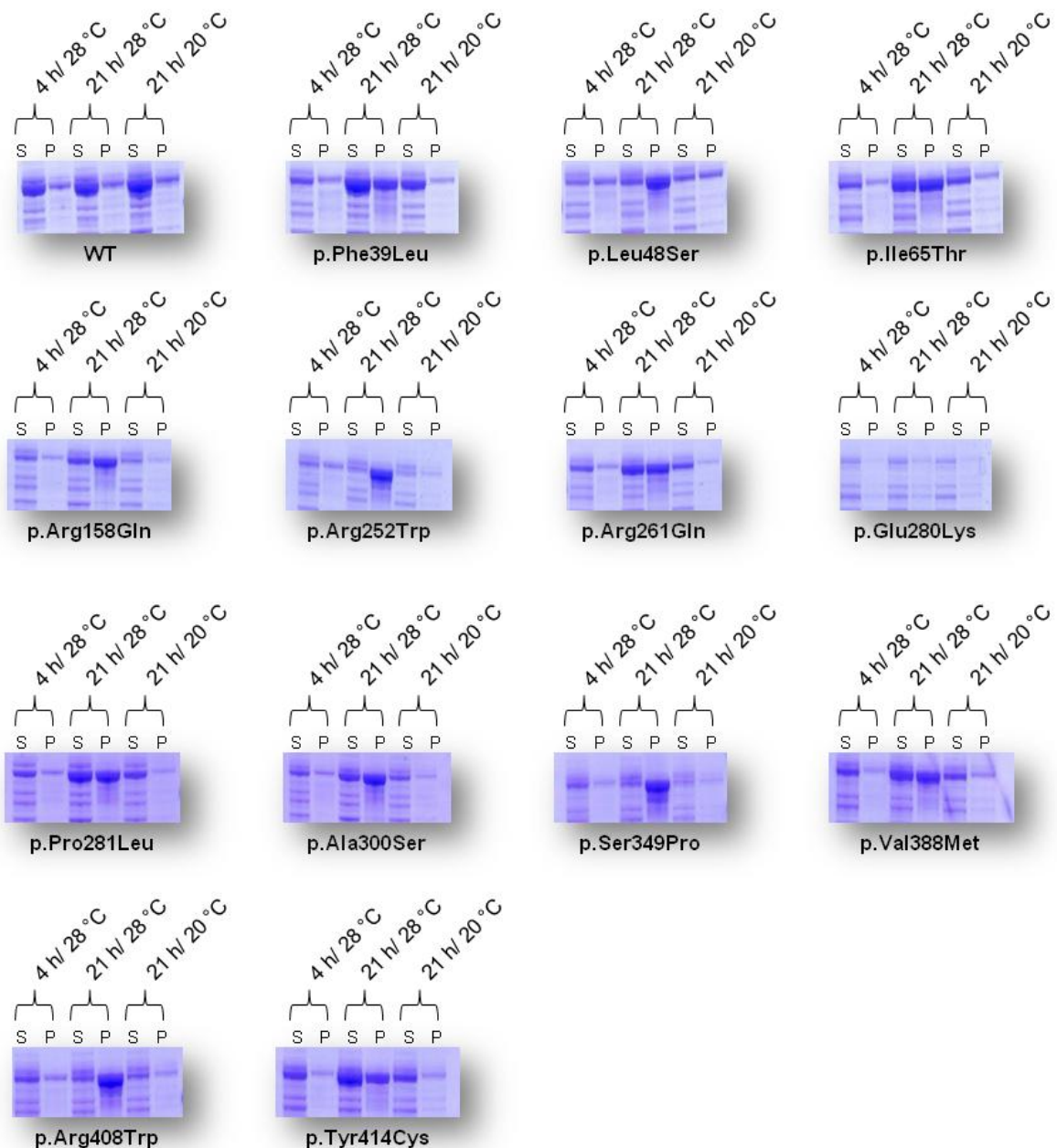


Abbildung 9: Expressionstests rekombinanter WT-PAH und varianter PAH

Die Proteinexpression wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (4 h und 21 h) beendet. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Postinduktionstemperaturen (20 °C und 28 °C) gewählt. (S) lösliche Proteinfraction, (P) unlösliche Proteinfraction. Die Expressionstests wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, abgebildet ist der erste Expressionstest.

Analyse der PAH-Gesamtproteinmengen

Die PAH-Proteinmenge der löslichen und unlöslichen Fraktionen wurde im Vergleich zum Wildtyp bewertet. Insgesamt war diese für alle Mutationsvarianten moderat bis hoch. Eine Ausnahme bildete die *missense* Mutation p.Glu280Lys, die eine kaum nachweisbare Proteinausbeute induzierte (Abbildung 10).

Im Vergleich der Gesamtproteinmengen der Varianten mit dem Wildtyp, für die jeweils höchste Ausbeute der drei Expressions-Konditionen, wurde folgendes beobachtet: Die

WT-PAH und die varianten Proteine p.Phe39Leu, p.Ile65Thr, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu und p.Val388Met zeigten eine Intensität der Proteinbanden von > 9000. Eine mittlere Intensität > 6000 wurde für p.Leu48Ser, p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Ala300Ser, p.Ser349Pro, p.Arg408Trp und p.Tyr414Cys detektiert. p.Glu280Lys zeigte eine kaum nachweisbare Intensität und damit eine fast vollständig fehlende PAH-Proteinmenge.

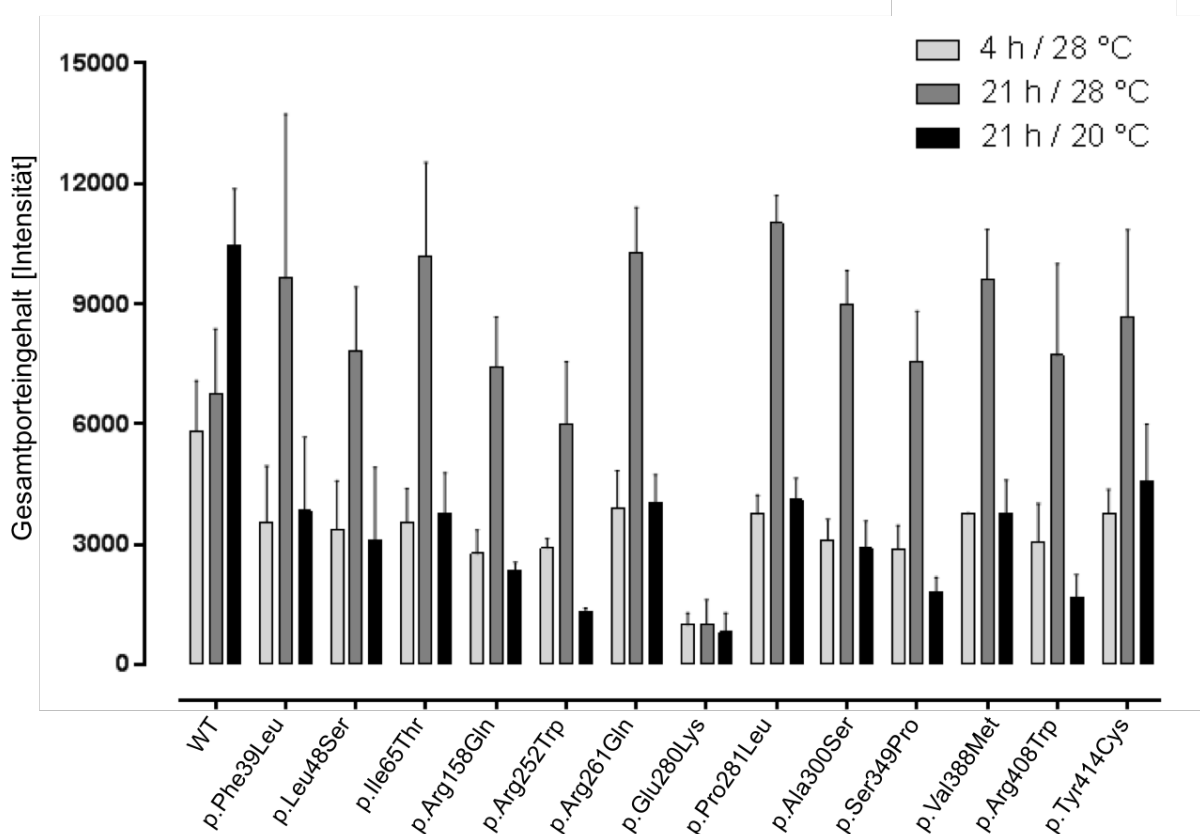


Abbildung 10: Gesamtproteingehalt von Wildtyp und varianter PAH nach Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten und bei unterschiedlichen Postinduktionstemperaturen

Für die Berechnung der totalen Proteinmengen wurde die Intensität der Banden mittels Image J-Software analysiert und zur WT-PAH ins Verhältnis gesetzt.

Analyse der PAH-Proteinmengen bei unterschiedlicher Expressionsdauer und bei verschiedener Postinduktionstemperaturen

Im Vergleich der drei unterschiedlichen Expressions-Konditionen zeigte die WT-PAH den höchsten Proteingehalt nach 21 h Expression bei 20 °C. Den niedrigsten Ertrag erbrachte die WT-PAH-Expression bei 28 °C für 4 h. Für die PAH-Varianten erfolgte die höchste Gesamtproteinausbeute nach 21 h Expression bei 28 °C. Den geringsten Proteingehalt im Vergleich der drei verschiedenen Expressions-Bedingungen zeigten variante Proteine nach 21 h bei 20 °C: p.Leu48Ser, p.Arg158Gln, p.Arg252Trp,

p.Glu280Lys, p.Ala300Ser, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp. Für weitere PAH-Varianten wurde die geringste Proteinmenge nach 4 h und 28 °C gemessen: p.Phe39Leu, p.Ile65Thr, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu und p.Tyr414Cys. Die Mutation p.Ala300Ser zeigte bei einer Proteinexpression für 4 h bei 28 °C und 21 h bei 20 °C jeweils gleiche Proteinmengen.

Analyse der löslichen und unlöslichen PAH-Proteinmengen bei unterschiedlicher Expressionsdauer und bei verschiedenen Postinduktionstemperaturen

Der Proteingehalt der löslichen und unlöslichen Fraktionsproben wurde nachstehend ins Verhältnis (Ratio) gesetzt (Abbildung 11).

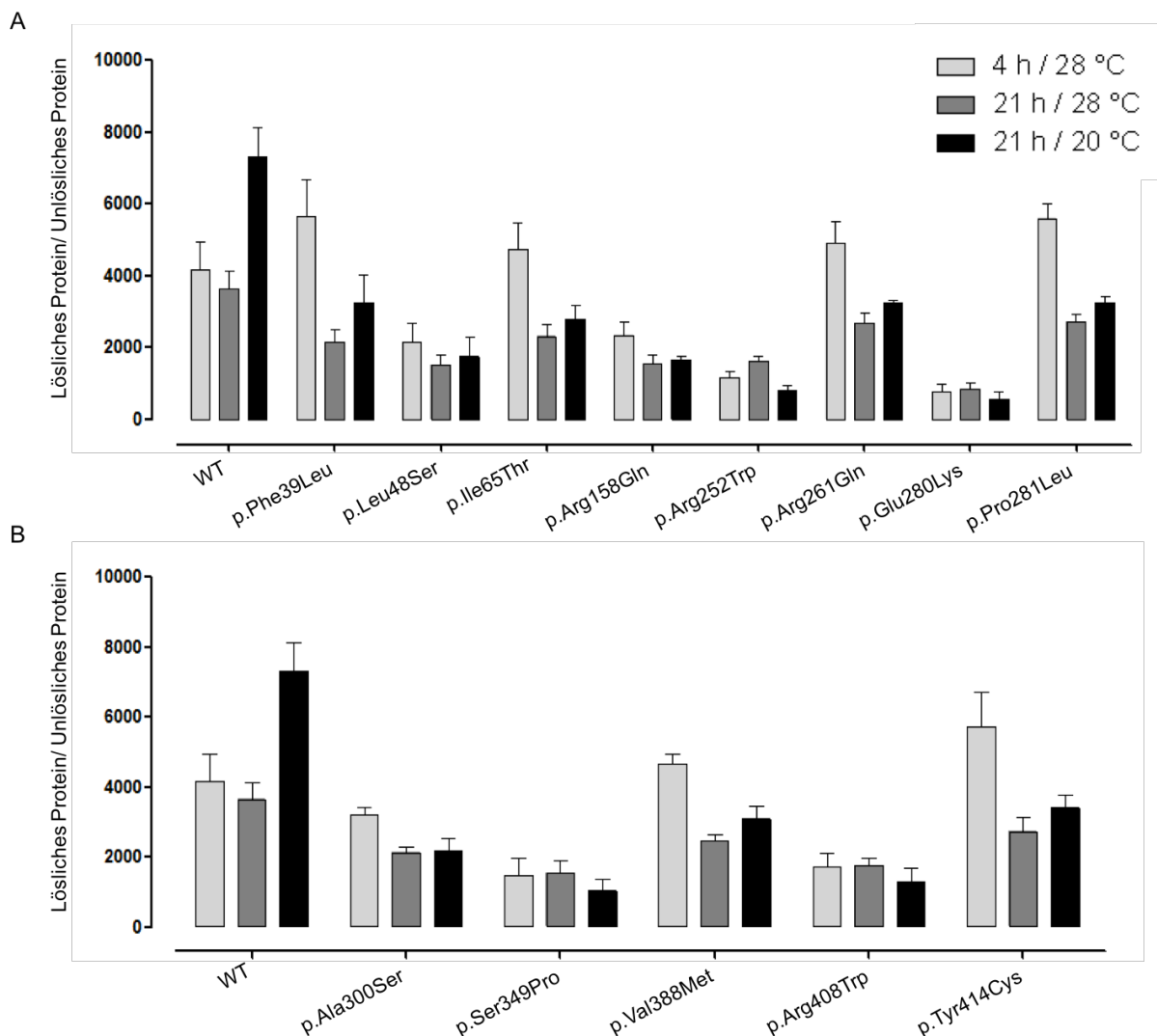


Abbildung 11: Ratio der Enzymmengen der löslichen zur unlöslichen Proteinfraction

Der Vergleich der verschiedenen Untersuchungsbedingungen während der Expression zeigte, dass der Wildtyp und alle PAH-Mutationen außer p.Glu280Lys, die

höchsten Mengen löslichen Proteins bei 20 °C für 21 h aufweisen. Hier erzielten der Wildtyp sowie folgende Varianten eine löslich/unlöslich-Ratio > 3 : p.Phe39Leu, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Val388Met und p.Tyr414Cys. Alle weiteren Varianten (p.Leu48Ser, p.Ile65Thr, p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp) erreichten Werte > 1 .

Bei einer Postinduktionstemperatur von 28 °C für 21 h wurde in allen Fällen, außer für den Wildtyp und p.Glu280Lys, der geringste Anteil löslichen Proteins nachgewiesen. Das Verhältnis der löslichen zur unlöslichen Fraktion fiel wie folgt aus: Der Wildtyp und p.Tyr414Cys erreichten eine Ratio > 2 , p.Phe39Leu < 2 aber > 1 . Bei allen anderen Mutationen überwog bei den o.g. Konditionen der Proteinexpression die Menge des unlöslichen Anteils (< 1).

Die Ratio der Fraktionen nach 4 h Expression bei 28 °C zeigte für die Mutationen p.Ile65Thr, p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp Ratio-Werte > 1 . Für die PAH-Varianten p.Phe39Leu, p.Leu48Ser, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Glu280Lys, p.Ala300Ser, p.Val388Met, p.Tyr414Cys und die WT-PAH ergab sich ein Verhältnis > 2 .

Zusammenfassend wurde beim Vergleich der Expressions-Bedingungen für die WT-PAH die höchste Gesamtproteinmenge bei 20 °C für 21 h nachgewiesen. Der größte Anteil löslichen Proteins wurde ebenfalls nach Expression bei den o.g. Bedingungen gemessen.

Für die ausgewählten PAH-Mutationen führte die Expression für 21 h bei 28 °C zum höchsten Proteinertag im Vergleich zu einer Proteinexpression bei niedrigerer Temperatur oder früherer Terminierung. Der Anteil löslichen Proteins im Verhältnis zu unlöslichem Protein war jedoch bei 20 °C für 21 h am größten. Eine Ausnahme bildete p.Glu280Lys, dessen Proteinexpression nach 4 h bei 28 °C am meisten unlösliches Protein zeigte, jedoch insgesamt eine sehr niedrige Proteinausbeute auswies.

Insgesamt war die Proteinmenge für lösliches Protein im Vergleich zu unlöslichem bei niedrigen Postinduktionstemperaturen höher. Anhand der gemessenen Intensität der Proteinbanden auf SDS-Gelen konnten im Vergleich zum Wildtyp die höchsten Mengen löslichen Proteins für folgende PAH-Varianten dokumentiert werden: p.Phe39Leu, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Val388Met, p.Tyr414Cys. Die Varianten p.Leu48Ser, p.Ile65Thr, p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp zeigten verglichen mit den o.g. PAH-Varianten geringere Mengen löslichen Proteins. Es zeigte sich kein Zusammenhang zur Höhe des Proteingehalts und zur jeweilig von der Mutation betroffenen Proteindomäne.

4.2.2 Proteinreinigung von PAH-Wildtyp und PAH-Varianten

Die durch Affinitätschromatographie isolierten PAH-Proteine des Wildtyps und der Varianten wurden durch Größenausschlusschromatographie ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Größenausschlusschromatogramme dienten der Analyse der Oligomerisierung und damit des funktionellen Status der PAH-Varianten. Die Mutationsvariante p.Leu48Ser wurde in den folgenden Experimenten mit dem Vektor pMalc2e rekombinant exprimiert, da die Aufreinigung des Proteins mit Geneinsatz im Vektor pMalc2x-DEST nicht möglich war.

4.2.2.1 Analyse der Oligomerisierungsprofile der rekombinanten PAH-Varianten

Die Proteine wurden größenausschlusschromatographisch nach ihrer Größe getrennt. Der Auftrag der eluierten Fraktionsvolumina (ml) (x-Achse) zur *Absorbance* (mAu) (Y-Achse) der Proteine gab Aufschluss über den Oligomerisierungsstatus (Abbildung 12). PAH-Varianten, die in Expressionstests einen hohen Anteil an löslichem Protein aufwiesen, wurden mittels ÄktaXpress aufgereinigt (Abbildung 12 A-C). Um eine weitere Proteinverdünnung zu verhindern, wurden MBP-PAH, die vornehmlich unlösliches Protein aufwiesen, auf dem ÄktaPurifier gereinigt (Abbildung 12 D). Die WT-PAH zeigte im Oligomerisierungsprofil einen schmalen hohen Peak bei ca. 150 ml Elutionsvolumen am höchsten Punkt. Die gesammelten Fraktionen dieses Peaks enthielten PAH-Tetramere. Ein zweiter Peak bei ca. 220 ml enthielt Degradationsprodukte (Abbildung 12 A, B, C).

Folgende PAH-Varianten wiesen ein Wildtyp-ähnliches Oligomerisierungsprofil auf, unabhängig von der Lokalisation der Mutation im Protein: p.Phe39Leu, p.Ile65Thr, p.Arg158Gln, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Val388Met, p.Tyr414Cys (Abbildung 12 A, B, C) und p.Leu48Ser (Abbildung 12 D). Die Mutationen p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp zeigten keinen Tetramer-Peak (Abbildung 12 D).

PAH-Proteine mit Mutationen in der regulatorischen Domäne zeigten insgesamt ein Wildtyp-ähnliches Chromatogramm, jedoch bei einem kleineren Peak im Vergleich zum Wildtyp und damit einhergehender reduzierter PAH-Tetramerausbeute. Dies galt vor allem für p.Ile65Thr. Des Weiteren zeigten beide PAH-Varianten (p.Phe39Leu, p.Ile65Thr) einen ausgeprägten Schulterpeak vor der Tetramerspitze, höchstwahrscheinlich durch Aggregate bedingt (Abbildung 12 A).

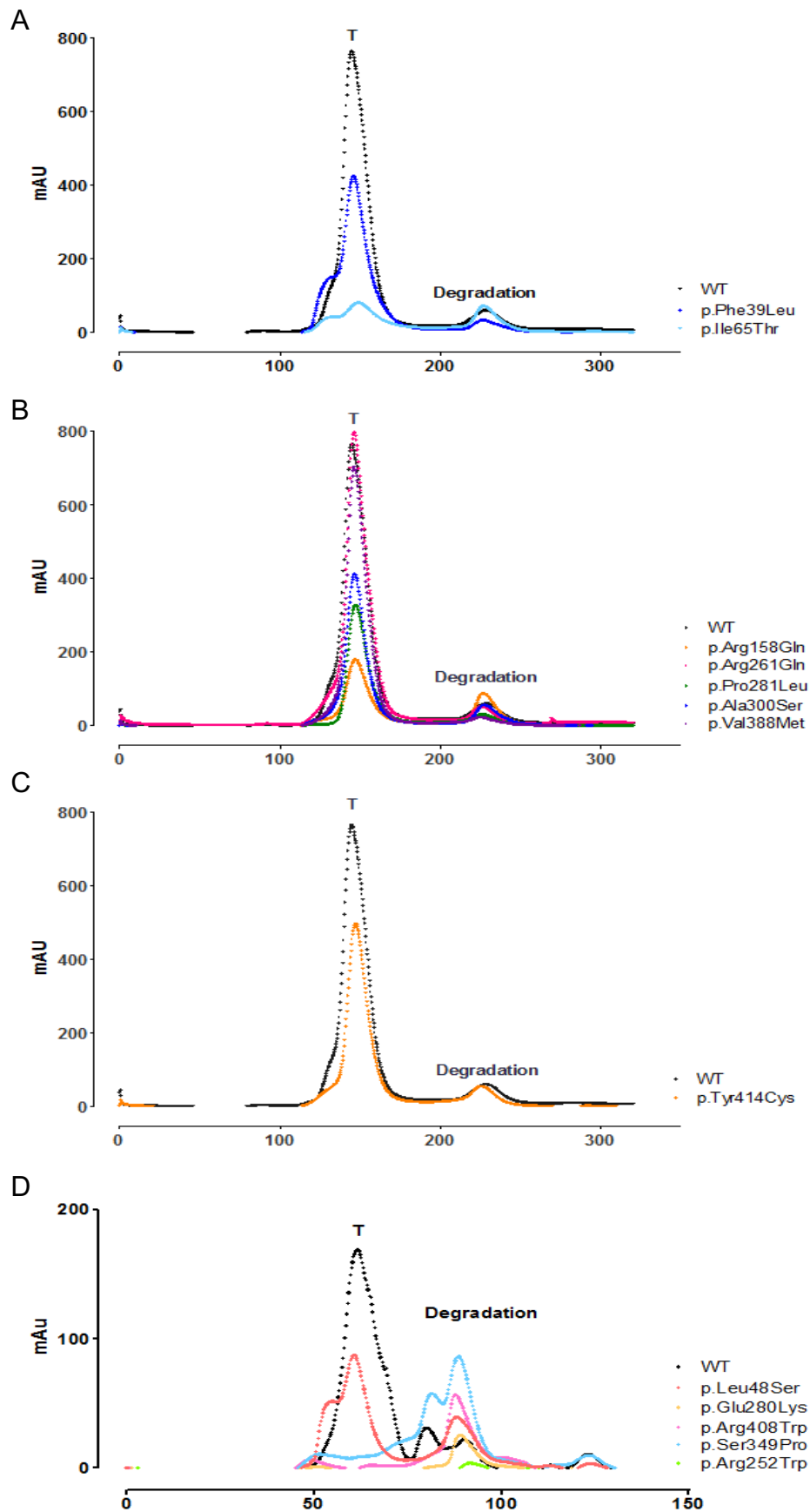


Abbildung 12: Oligomerisierungsprofile der WT-PAH und varianter PAH

T: Tetramer-Peak. (A) Oligomerisierungsprofile (OP) der WT-PAH und der Mutationen in der regulatorischen Domäne. (B) OP der WT-PAH und der Mutationen in der katalytischen Domäne. (C) OP der WT-PAH und der Mutationen in der Oligomerisierungsdomäne. (D) OP der WT-PAH und der PAH-Varianten, die nicht als Tetramere zu reinigen waren.

Für Phenylalaninhydroxylasen mit Mutationen in der katalytischen Domäne wurden niedrigere Tetramer-Peaks bei gleicher Konfiguration im Vergleich zur WT-PAH detektiert. Im Vergleich zu anderen Mutationen in der katalytischen Domäne wies p.Arg158Gln die geringste Menge an PAH-Tetrameren auf. Zusätzlich zeigte das Chromatogramm im Vergleich zu den anderen Oligomerisierungsprofilen der PAH-Varianten einen höheren Degradationspeak. Der Peak der Variante p.Arg261Gln erreichte dieselbe Höhe wie der des Wildtyps (Abbildung 12 B).

Die PAH-Mutation in der Oligomerisierungsdomäne (p.Tyr414Cys) wies ein Wildtyp-ähnliches Oligomerisierungsprofil und einen Peak in moderater Höhe auf (Abbildung 12 C).

Aus der Gruppe der PAH Varianten, die in den Expressionstests nur einen geringen löslichen Proteingehalt zeigten, konnte nur für p.Leu48Ser (Mutation in der regulatorischen Domäne) ein Tetramer-Peak nachgewiesen werden. Dieses Chromatogramm zeigte zudem Aggregate und Degradationsprodukte. Die Varianten p.Arg252Trp und p.Glu280Lys (Mutationen der katalytischen Domäne) zeigten fast vollständigen Proteinverlust, ohne definierten Peak im Aufreinigungsprofil. Die PAH-Mutation p.Ser349Pro (Mutation in der katalytischen Domäne) zeigte eine schwere Störung der Oligomerisierung mit fast gleichen Anteilen an Monomeren und Degradationsprodukten. Die Variante p.Arg408Trp (Mutation in der Oligomerisierungsdomäne) eluierte vor allem als degradiertes Protein.

Insgesamt konnte der Oligomerisierungs-Status der PAH-Varianten wie folgt bewertet werden:

- (i) Folgende PAH-Varianten konnten als Tetramer, das dem funktionellen Status des Proteins entspricht, gereinigt werden: p.Phe39Leu, p.Leu48Ser, p.Ile65Thr, p.Arg158Gln, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Val388Met und p.Tyr414Cys.
- (ii) Die Mutationen p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp zeigten keinen Tetramer-Peak im Oligomerisierungsprofil.
- (iii) Die Störung der Oligomerisierung der PAH war unabhängig von der Lokalisation der Mutation in den jeweiligen Domänen.

4.2.2.2 Qualitätskontrolle durch SDS-Gelelektrophorese

Nach Größenausschlusschromatographie und anschließender Vereinigung der tetrameren Proteinfractionen wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels SDS-PAGE wurde die Reinheit der aufgereinigten MBP-PAH-Proteine analysiert.

SDS-PAGE für WT-PAH und PAH-Varianten, die in tetramerer Form eluierten

Die aufgereinigten Fusionsproteine (Geneinsatz im Vektor pMalc2-x-DEST) wurden auf einer Höhe von ca. 95 kDa detektiert. Dies entspricht dem molekularen Gesamtgewicht eines PAH-Monomers (52 kDa) mit MBP-Tag (43 kDa) (Abbildung 13).

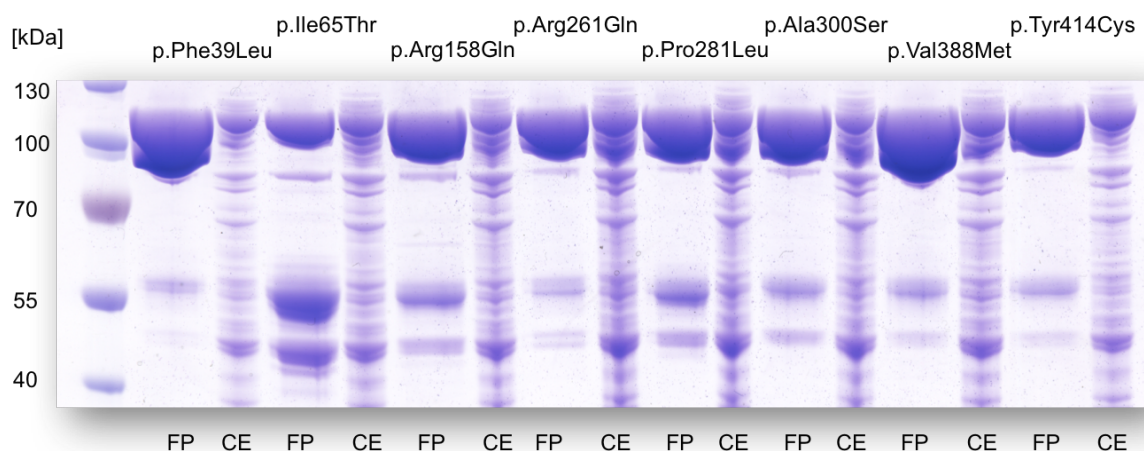


Abbildung 13: SDS-PAGE aufgereinigter PAH-Varianten

MBP-PAH Proteine wurden nach Größenausschlusschromatographie vereinigt und aufkonzentriert. Ihre Reinheit wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Zum Vergleich wurde der Rohextrakt der großskaligen Expressionen verwendet.

FP: Fusionsprotein; CE: *Crude extract* (Rohextrakt). Proteinladder in [kDa].

Die Proben der PAH-Varianten präsentierten sich insgesamt rein (Abbildung 13). Alle MBP-PAH Varianten wurden auf gleicher Höhe detektiert und waren homogen. Die Variante p.Ile65Thr zeigte eine zusätzliche Bande einer Größe von ca. 52 kDa. Diese könnte durch Degradation oder Verlust des MBP-Tags bedingt sein. Im Gegensatz zu den gereinigten Proteinen zeigten die Rohextrakte eine Vielzahl von Banden, die für die Anwesenheit von Proteinfractionen sprechen, die durch den Reinigungsprozess eliminiert werden konnten.

SDS-PAGE für WT-PAH und PAH-Varianten, die nicht in tetramerer Form eluierten

Mutationsformen, deren Proteine sich nicht als Tetramer reinigen ließen, wurden nach der Affinitätschromatographie als sogenannte Amylose-Fractionen aufgefangen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Eine Probe der WT-PAH nach

Größenausschlusschromatographie wurde als Referenz verwendet (Abbildung 14). Im Vergleich zum Rohextrakt zeigten sich, außer für p.Glu280Lys, einzelne, konzentrierte Banden der Amylose-Fractionen auf Höhe der Fraktion des Wildtyps. Insgesamt sind die Banden der varianten PAH der Amylose-Fractionen im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Intensität abgeschwächt.

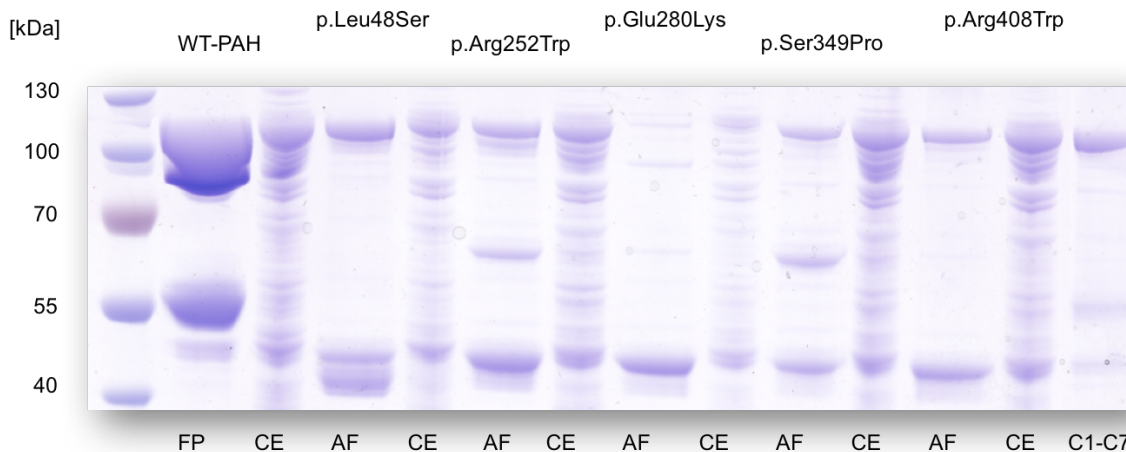


Abbildung 14: Qualitätskontrolle der Amylose-Fractionen nach Affinitätschromatographie

Für die Analyse der Reinheit der Amylose-Fractionen wurden zusätzlich der Rohextrakt vor Affinitätschromatographie und der Wildtyp (nach Größenausschlusschromatographie) auf das SDS-Gel aufgetragen.

FP: Fusionsprotein; CE: *Crude extract* (Rohextrakt); AF: Amylose-Fraktion; Proteinladder in [kDa].

SDS-PAGE für WT-PAH und p.Leu48Ser

Das Einfügen der DNS-Sequenzen für WT-PAH und p.Leu48Ser erfolgte zusätzlich in den Vektor pMalc2e-Vektor, da sich p.Leu48Ser im Vektor pMalc2x-DEST nicht als Tetramer aufreinigen ließ. Nach der Proteinexpression fand die Reinigung auf dem ÄktaPurifier statt. Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE wurden aus dem Rohextrakt, nach Affinitätschromatographie (Amylose-Fraktion) und nach Größenausschlusschromatographie entnommen und aufgetragen (Abbildung 15). Die Rohextrakte von Wildtyp und p.Leu48Ser zeigten multiple Banden. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die AF und das FP eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 95 kDa. Die Proben nach Größenausschlusschromatographie zeigten im Vergleich zur Amylose-Fraktion und Rohextrakt die geringste Zahl zusätzlicher Banden.

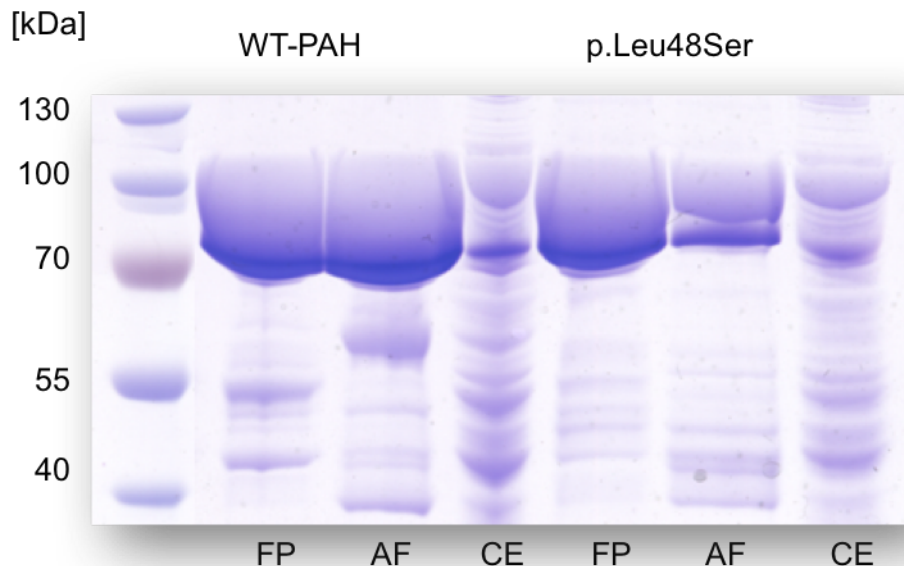


Abbildung 15: Qualitätskontrolle aufgereinigter PAH-Proteine im Vektor pMalc2e

Die Reinheit der Proteinproben wurde im Vergleich zum Rohextrakt überprüft.

FP: Fusionsprotein; AF: Amylose-Fraktion; CE: *Crude extract* (Rohextrakt); Proteinladder in [kDa].

4.2.2.3 Analyse der instabilen oder aggregierenden Proteine mittels Native-PAGE

Für die Analyse nicht als Tetramer aufzureinigender PAH-Proteine wurden Proben nach Reinigung durch Affinitätschromatographie sowie Proben ausgewählter Fraktionen nach Größenausschlussschusschromatographie auf native Gele aufgetragen, um mögliche vorhandene Proteine in ihrer Quartärstruktur darzustellen. Hierfür wurde das Größenausschlussschusschromatogramm analysiert und Fraktionen gewählt, die einen definierten Peak zeigten. Des Weiteren wurde das Maltose-bindende Protein, WT-PAH und eine Protein Ladder als Referenz aufgetragen. Das tetramere MBP-PAH Fusionsprotein zeigte ein Molekulargewicht von 380 kDa. MBP zeigte ein Molekulargewicht von 43 kDa. Das Molekulargewicht von WT-PAH und MBP war auf dem nativen Gel höher als erwartet. Ursache dafür war wahrscheinlich, dass die Laufzeit für die Proben auf dem Gel zu kurz gewählt wurde. (Abbildung 16).

p.Arg252Trp und p.Glu280Lys zeigten in den Amylose-Fraktionen und Proben der Größenausschlussschusschromatographie einen vollständigen Verlust tetrameren Proteins. Banden < 146 kDa entsprachen dem Nachweis von Degradationsprodukten. Interessanterweise zeigte p.Arg408Trp bei den Proben der Amylose-Fraktion und Fraktionen C1-C7 eine schwache Bande auf Höhe des tetrameren Proteins. Vor allem für die Fraktionen D1-D7 wurden vermehrt Degradationsprodukte detektiert.

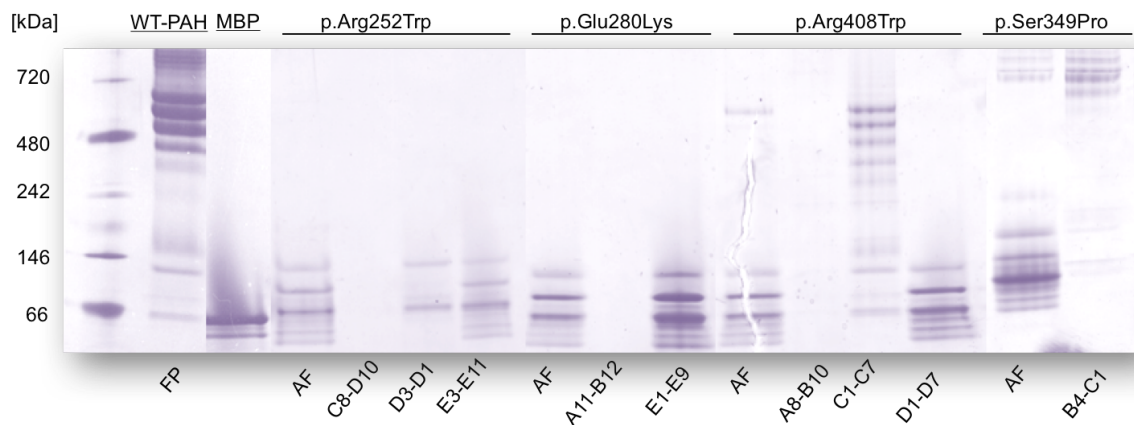


Abbildung 16: Native Gele

FP: Fusionsprotein; AF: Amylose-Fractionen; MBP: Maltose-bindendes Protein; Buchstabe und Zahl (z.B. C8) betiteln jeweils die gewählten Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie.

Die Variante p.Ser349Pro zeigte Banden eines höheren Molekulargewichts als für tetrameres WT-Protein. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Aggregationsprodukte. Auffällig zeigte sich hier weiterhin eine Bande in der Probe der Amylose-Fraktion, die wahrscheinlich durch Degradationsprodukte verursacht wurde.

Zusammenfassend haben die Native-PAGE Analysen zu folgenden Erkenntnissen geführt:

- (i) p.Arg252Trp und p.Glu280Lys führen zu einem vollständigen Verlust des tetrameren PAH-Proteins.
- (ii) p.Arg408Trp führt zu geringen Mengen tetrameren Proteins.
- (iii) p.Ser349Pro führt zu Proteinaggregation und -degradation.

4.3 Bestimmung der spezifischen PAH-Aktivität am gereinigten rekombinanten Protein

Für die Bestimmung der spezifischen PAH-Aktivität *in vitro* wurden Endpunktmessungen mit gereinigter, rekombinanter MBP-PAH durchgeführt. Hierfür wurden nur PAH-Varianten verwendet, die zuvor als tetrameres Protein gereinigt werden konnten.

4.3.1 Diskontinuierliche Endpunktmessungen

Die Messung der PAH-Enzymaktivitäten erfolgte nach Durchführung sogenannter PAH *activity assays* für den Wildtyp und variante PAH. Diese erfolgten ohne und mit

Präinkubation mit dem Substrat L-Phe. Zur Bestimmung des Substratumsatzes wurde die Produktkonzentration (L-Tyrosin) quantifiziert. Der Wert *activation fold* wurde berechnet, um das Verhältnis der V_{\max} -Werte mit und ohne Substrataktivierung aufzuzeigen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Endpunktenzymaktivitätsmessungen prokaryot exprimierter PAH

| PAH Mutation | Ohne (L-Phe) Präinkubation^a | Mit (L-Phe) Präinkubation^b | <i>activation fold</i>^d |
|-------------------------|---|--|---|
| | V_{\max}^c [nmol/min*mg] | V_{\max}^c [nmol/min*mg] | |
| WT | 7324 ± 440 | 10599 ± 355 | 1,45 |
| p.Phe39Leu | 7916 ± 317 | 9385 ± 619 | 1,19 |
| p.Leu48Ser ^e | 5669 ± 365 | 6762 ± 384 | 1,2 |
| p.Ile65Thr | 3942 ± 139 | 5064 ± 434 | 1,28 |
| p.Arg158Gln | 573 ± 23 | 468 ± 20 | 0,82 |
| p.Arg261Gln | 8373 ± 547 | 10211 ± 348 | 1,22 |
| p.Pro281Leu | 134 ± 9 | 121 ± 9 | 0,90 |
| p.Ala300Ser | 5425 ± 742 | 8415 ± 770 | 1,55 |
| p.Val388Met | 8022 ± 563 | 10388 ± 1703 | 1,29 |
| p.Tyr414Cys | 4685 ± 295 | 6123 ± 36 | 1,31 |

^aDas Enzym wurde nicht mit seinem Substrat voraktiviert, Kofaktor und Substrat wurden zur selben Zeit der Lösung hinzugefügt. ^bDas Enzym wurde mit seinem Substrat voraktiviert. ^cDie Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt. ^dDer *activation fold* repräsentiert die Substraktaktivierung als das Verhältnis zwischen spezifischer Aktivität mit und ohne Präinkubation der PAH mit L-Phe. ^eDiese Mutation wurde mit dem Vektor pMalc2e rekombinant exprimiert.

Die Enzymaktivitäten der PAH-Mutationen waren insgesamt niedriger als die des Wildtyps (Tabelle 9). Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für die PAH-Varianten p.Phe39Leu, p.Arg261Gln, p.Ala300Ser und p.Val388Met im Vergleich zum Wildtyp betrugen > 75 %. p.Leu48Ser, p.Ile65Thr und p.Tyr414Cys zeigten eine V_{\max} von etwa 50 % des Wildtyps.

Die Varianten p.Arg158Gln und p.Pro281Leu zeigten weniger als 5 % Aktivität.

In allen Fällen, außer bei p.Arg158Gln und p.Pro281Leu mit jeweils sehr geringer Enzymaktivität, führte die Substratinkubation zu einer Zunahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} (*activation fold* > 1).

Tabelle 9: Rest-Enzymaktivität im Verhältnis zum Wildtyp

| PAH Mutation | Enzymaktivität [%] |
|-------------------------|---------------------------|
| WT | 100 |
| p.Phe39Leu | 89 |
| p.Leu48Ser ^a | 49 |
| p.Ile65Thr | 48 |
| p.Arg158Gln | 4 |
| p.Arg261Gln | 96 |
| p.Pro281Leu | 1 |
| p.Ala300Ser | 79 |
| p.Val388Met | 98 |
| p.Tyr414Cys | 58 |

Für die Berechnung der Rest-Enzymaktivität wurden die V_{\max} -Werte der PAH-Varianten zum V_{\max} -Wert des Wildtyp ins Verhältnis gesetzt.

^aDiese Mutation wurde mit dem Vektor pMalc2e rekombinant exprimiert. Die Enzymaktivität wurde ins Verhältnis zu den V_{\max} -Werten der WT-PAH gesetzt, die ebenfalls in den Vektor pMalc2e kloniert wurde.

Darüber hinaus wurden PAH *activity assays* für die Amylose-Fractionen der PAH-Varianten durchgeführt, die nicht als Tetramer aufzureinigen waren.

Tabelle 10: Endpunktmessungen der Amylose-Fractionen prokaryot exprimierter PAH-Varianten

| PAH Mutation | Mit (L-Phe) Präinkubation^a | Enzymaktivität |
|--|--|-----------------------|
| Amylose-Fractionen der Affinitätschromatographie | V_{\max} [nmol/min*mg] | [%] |
| WT | 2532 ± 146 | 100 |
| p.Leu48Ser | 329 ± 15 | 13 |
| p.Arg252Trp | 90 ± 11 | 4 |
| p.Glu280Lys | 123 ± 9 | 5 |
| p.Ser349Pro | 89 ± 6 | 4 |
| p.Arg408Trp | 192 ± 16 | 8 |

^aDas Enzym wurde mit seinem Substrat voraktiviert.

Die Enzymaktivität wurde ins Verhältnis zu den V_{\max} -Werten der WT-PAH gesetzt. Die Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

Die Variante p.Leu48Ser konnte im Vektor pMalc2x-DEST nicht als Tetramer aufgereinigt werden, so dass eine Amylose-Fraktion für Endpunktmessungen

aufgefangen wurde. Kloniert in den Vektor pMalc2e konnten PAH-Tetramere aufgereinigt und für Endpunktmessungen verwendet werden (Tabelle 8).

Der Substratumsatz (V_{\max}) zeigte sich für alle Amylose-Fractionen der Varianten im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt (Tabelle 10).

Zusammenfassend ergaben die Experimente mit diskontinuierlichen Endpunktmessungen der PAH-Aktivität folgende Ergebnisse:

- (i) Die Reaktionsgeschwindigkeiten der PAH-Varianten zeigten für sieben der neun Mutationsvarianten > 47 % Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp.
- (ii) p.Arg158Gln und p.Pro281Leu erreichten < 5 % Enzymaktivität verglichen mit dem Wildtyp.
- (iii) PAH-Varianten, die nach Proteinreinigung kein tetrameres Protein aufwiesen, zeigten kaum Enzymaktivität.

4.3.2 Kontinuierliche Enzymaktivitätsmessungen und Erstellung von PAH *activity landscapes*

Kontinuierliche Aktivitätsmessungen wurden durchgeführt, um die PAH-Kinetik im metabolischen Kontext der Substrat- und Kofaktor-Konzentrationen zu analysieren. Prokaryot exprimierte PAH-Proteine wurden einem fluoreszenzbasierten Echtzeit *activity assay* unterzogen und die Enzymaktivität in einem breiten Spektrum der Substrat- (L-Phe 0-4000 μM) und Kofaktor-Konzentrationen (BH_4 0-500 μM) gemessen. Die Ergebnisse wurden als dreidimensionale farbcodierte Landkarte der PAH-Funktion (PAH *activity landscape*) dargestellt (Abbildung 17).

Das *activity landscape* der WT-PAH zeigte ein Aktivitätsmaximum bei 6051 nmol/min*mg bei 461 μM L-Phenylalanin und 136 μM BH_4 . Der optimale Arbeitsbereich lag zwischen 135 μM ($[S_{0,5}]$) und 1405 μM (K_i) Substratkonzentration und 26 μM ($[C_{0,5}]$) bis 271 μM (K_i) Kofaktor-Konzentration. Für die Aufrechterhaltung der Aktivität stieg der BH_4 -Bedarf mit steigender L-Phe-Konzentration an.

Die Variante p.Ala300Ser zeigte ein wildtyp-ähnliches Muster bei verkleinertem Arbeitsoptimum bezüglich der L-Phenylalanin-Konzentration (K_i : 935 μM L-Phe). Die maximale Aktivität wurde, im Vergleich zum Wildtyp, bei fast gleichen Substrat- und niedrigeren Kofaktor-Konzentrationen (106 μM BH_4) erreicht (Tabelle 11). Zudem wurde ebenfalls bei steigenden L-Phe-Werten mehr BH_4 benötigt, um die gleiche Enzymaktivität zu erzielen.

Für die PAH-Varianten p.Phe39Leu und p.Ile65Thr zeigte sich im Vergleich zum nicht mutierten Enzym ein ähnliches *landscape*-Muster, jedoch wiesen beide Varianten eine erhöhte Affinität zu Substrat und Kofaktor auf. Dies äußerte sich durch niedrigere $S_{0,5}$ und $C_{0,5}$ Werte (Tabelle 11). Trotz dieser Linksverschiebung war der Arbeitsbereich von p.Phe39Leu, bei der die PAH noch > 50 % Aktivität aufwies, nur geringfügig verschmälert (K_i : 1347 μM L-Phe). Um die maximale Enzymaktivität zu erreichen, wurden im Vergleich zum Wildtyp geringere Substratkonzentrationen (381 μM) und Kofaktor-Konzentrationen (112 μM) benötigt.

Für die Mutation p.Ile65Thr fiel die Aktivität schon bei 676 μM Substratkonzentration unter 50 % ab. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit der PAH wurde im Vergleich zum Wildtyp bei niedrigeren BH_4 -Konzentrationen (105 μM BH_4), aber bei ähnlicher Substratkonzentration (481 μM) erreicht. Das Arbeitsoptimum dieser Variante erstreckte sich über eine relativ breite Kofaktor-Spanne (13-307 μM).

Die Variante p.Tyr414Cys zeigte ein linksverschobenes Arbeitsoptimum ($S_{0,5}$: 90 μM L-Phe) und eine links verschobene maximale Aktivität (371 μM L-Phe) bezüglich der Substratmenge. Insgesamt war die Spanne des optimalen Arbeitsbereiches im Vergleich zum Wildtyp vergrößert (K_i : 1679 μM L-Phe und 351 μM BH_4). Grund dafür war, dass nach einem ersten Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit die Aktivität wieder anstieg und ein sogenannter Doppelgipfel entstand (2. Peak bei 2952 nmol/min*mg und 2346-2386 μM L-Phe). Eine Doppelgipfligkeit wurde auch für p.Val388Met beobachtet (2. Peak bei 5552 nmol/min*mg und 2145-2175 μM L-Phe). Dieses Enzym zeigte hohe Aktivitäten bei einem breiten Arbeitsspektrum der Substrat- und Kofaktorkonzentrationen (Tabelle 11).

Die PAH-Variante p.Leu48Ser zeigte ein verbreitertes Arbeitsoptimum bei einem nicht klar definierten Aktivitäts-Peak. Interessanterweise wurde die maximale Aktivität bei 1043 μM L-Phe (143 μM BH_4) gemessen. Obwohl das Protein Aktivitäten > 50 % des V_{max} bei ähnlichen Substratkonzentrationen wie der Wildtyp erreichte ($S_{0,5}$: 124 μM L-Phe), musste die L-Phe Menge mehr als verachtfacht werden, um 100 % der möglichen Aktivität zu erreichen. Zudem stieg der Kofaktor-Bedarf bei steigender Substratkonzentration weniger steil an als beim Wildtyp. Für die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wurde im Vergleich zur benötigten Substratkonzentration und zum Wildtyp relativ wenig Kofaktor (143 μM BH_4) gebraucht.

Eine Rechtsverschiebung der höchsten Aktivität verglichen mit dem Wildtyp wurde für p.Arg261Gln verzeichnet. Der $S_{0,5}$ -Wert ist hier mehr als doppelt so hoch (290 μM L-Phe).

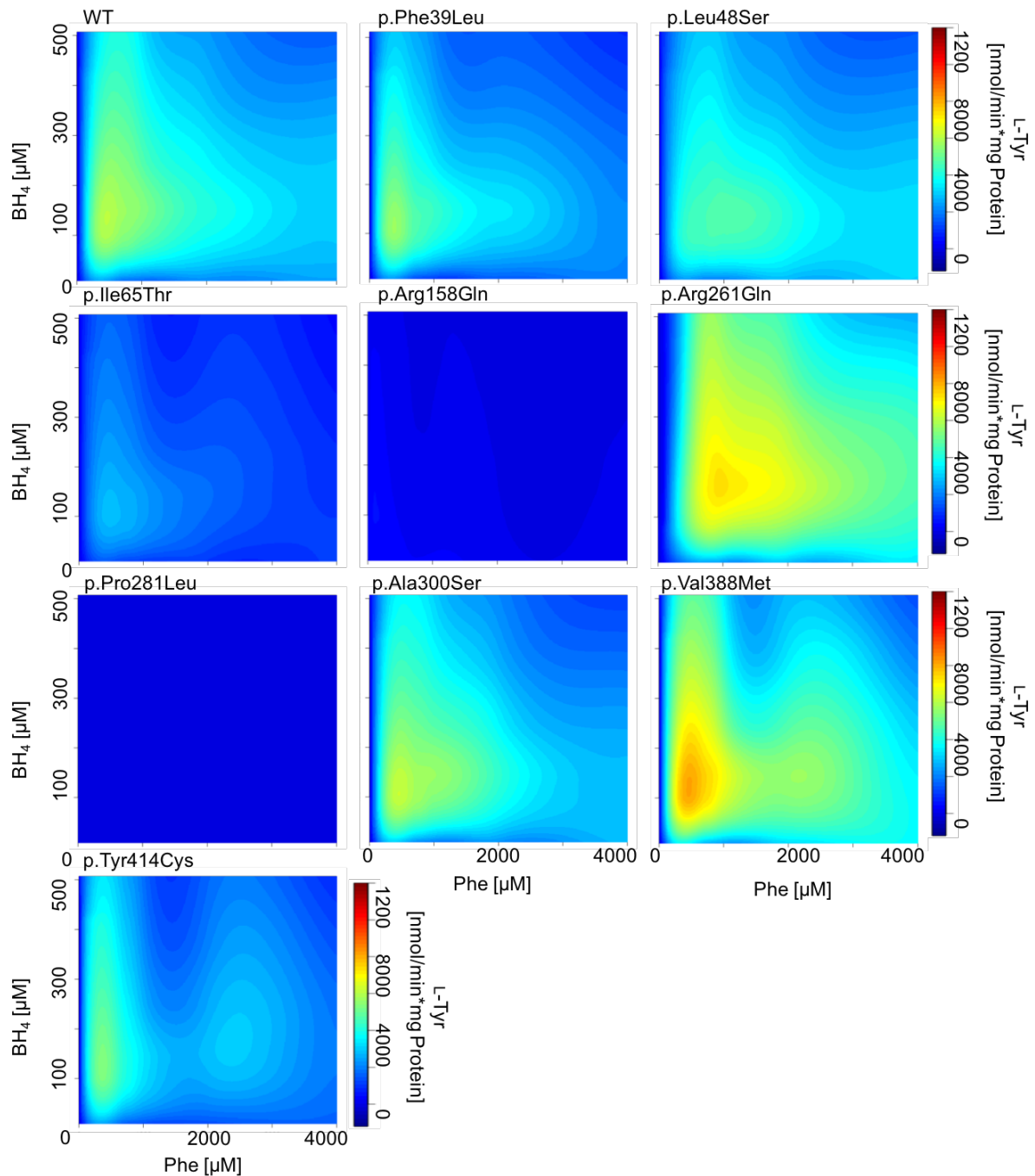


Abbildung 17: PAH activity landscapes der WT-PAH und von PAH-Varianten

Die spezifische Enzymaktivität rekombinanter PAH wurde in einem breiten Spektrum von L-Phenylalanin- und BH₄-Konzentrationen gemessen und als farbcodierte Landkarte dargestellt. Die PAH-Mutation p.Leu48Ser konnte nicht im Vektor pMalc2-x-DEST als Tetramer gereinigt werden. Das hier verwendete Enzym dieser Mutation wurde in den Vektor pMalc2e kloniert. Die *landscapes* werden als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

p.Arg158Gln zeigte keinen klar definierten Arbeitsbereich des Enzyms. Das Enzym erreicht schon bei sehr geringen Konzentrationen die höchste Aktivität, bei gleichzeitig geringem Kofaktor-Bedarf.

p.Pro281Leu zeigte keine Enzymaktivität. In diesem Experiment zeigten die PAH-Mutationen p.Arg261Gln, p.Ala300Ser und p.Val388Met höhere Aktivitäten im

Vergleich zum Wildtyp (> 100 %). p.Phe39Leu (93 %) und p.Tyr414Cys (88 %) erreichten beinahe die gleiche Aktivität wie der Wildtyp. p.Leu48Ser und Ile65Thr erreichten nur knapp die Hälfte der Enzymaktivität der nicht mutierten PAH. Wie schon zuvor konnte für p.Pro281Leu keine Aktivität und für p.Arg158Gln nur geringe Aktivität des Enzyms (8 %) gemessen werden.

Tabelle 11: Aktivitätsparameter und optimaler enzymatischer Arbeitsbereich der WT-PAH und der PAH-Varianten

| PAH Mutation | Max.Aktivität (V _{max}) | Spez. Aktivität | [L-Phe] bei V _{max} | [S] _{0.5} - K _i [*] | [BH ₄] bei V _{max} | [C] _{0.5} - K _i ^{**} |
|--------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------------|--|---|---|
| | [nmol/min*mg] | [%] | [μM] | [μM] | [μM] | [μM] |
| WT | 6051 | 100 | 461 | 135 - 1405 | 136 | 26 - 271 |
| p.Phe39Leu | 5631 | 93 | 381 | 83 -1347 | 112 | 19 -178 |
| p.Leu48Ser | 4750 | 52 | 1043 | 124 -2340 | 143 | 18 – 200 |
| p.Ile65Thr | 2823 | 47 | 481 | 96 - 676 | 105 | 13 – 307 |
| p.Arg158Gln | 491 | 8 | 110 | 16 - 52 | 100 | 7 – 205 |
| p.Arg261Gln | 7366 | 122 | 962 | 290 -523 | 165 | 27 -374 |
| p.Pro281Leu | 29 | 0 | 230 | n.m. | 414 | n.m. |
| p.Ala300Ser | 6229 | 103 | 451 | 112 - 935 | 106 | 15 – 266 |
| p.Val388Met | 8120 | 134 | 461 | 109 -1830 | 119 | 19 – 276 |
| p.Tyr414Cys | 5309 | 88 | 371 | 90 - 1679 | 131 | 17 - 351 |

*[S]_{0.5} – K_i beinhaltet das Arbeitsoptimum der PAH (Aktivität > 50 %) für die Substratkonzentration.

**[C]_{0.5} – K_i beinhaltet das Arbeitsoptimum der PAH (Aktivität > 50 %) für die Kofaktor-Konzentration.

*** Die Daten wurden durch Nonlineare Regression mit GraphPad Prism 5 berechnet.

Die Mutation p.Leu48Ser wurde in den Vektor pMalc2e kloniert. Die Aktivitätsberechnungen wurden ins Verhältnis zu einer WT-PAH in pMalc2e gesetzt.

n.m.: nicht messbar

Die Werte werden als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

Zusammenfassend ergaben die Experimente mit Erstellung von PAH *activity landscapes* folgende Ergebnisse

- (i) p.Ala300Ser zeigte ein Wildtyp-ähnliches Aktivitätsmuster, bei schmalere Arbeitsoptimum und höherer Enzymaktivität.
- (ii) Die PAH-Varianten p.Leu48Ser, p.Arg261Gln, p.Val388Met und p.Tyr414Cys zeigten erweiterte Arbeitsoptima bzw. Doppelgipfligkeit, wobei p.Leu48Ser

jedoch nur 52 % Gesamtaktivität im Vergleich zum Enzym des Wildtyps aufwies.

- (iii) Die Varianten p.Phe39Leu, p.Ile65Thr und p.Tyr414Cys zeigten ein linksverschobenes Arbeitsoptimum zu niedrigen Phenylalaninkonzentrationen.
- (iv) Für p.Arg261Gln wurde eine Rechtsverschiebung der Enzymaktivität zu höheren Phenylalaninkonzentrationen beobachtet.
- (v) Für p.Arg158Gln und p.Pro281Leu konnte kein klar definiertes Arbeitsoptimum bestimmt werden.

4.4 Analyse der PAH-Enzymaktivität nach Expression der PAH-Mutationen in Zellkultur

Für die Analyse des Einflusses des eukaryoten Zellumfeldes auf die Eigenschaften der PAH-Varianten wurden die DNS-Konstrukte des Wildtyps und varianter PAH in COS-7-Zellen transfiziert. Das aus den transfizierten COS-7-Zellen gewonnene Protein-Lysat wurde für die diskontinuierlichen Endpunktmessungen verwendet und die Restproteinmenge analysiert.

4.4.1 Diskontinuierliche Endpunktmessungen

Tabelle 12 zeigt die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{\max}) der eukaryot exprimierten PAH-Enzyme in *activity assays*.

Im Vergleich zu Endpunktmessungen prokaryot exprimierter PAH waren die V_{\max} -Werte vermindert (z.B. WT-PAH prokaryotes Zellsystem V_{\max} 10.599.000 pmol/min*mg; WT-PAH eukaryotes Zellsystem V_{\max} 17.914 pmol/min*mg).

In diesem Experiment zeigte ebenfalls der Wildtyp die höchste Aktivität. Die Restaktivität der PAH-Varianten war insgesamt niedriger als bei *activity assays* mit rekombinanter, gereinigter PAH. Darüber hinaus zeigte der Wildtyp eine sehr viel höhere Aktivität im Vergleich zu den Enzymaktivitäten der PAH-Varianten. Zusammenfassend ist die Enzymaktivität der PAH-Varianten nach Expression im eukaryoten Zellsystem niedriger als die spezifische Enzymaktivität prokaryot exprimierter PAH.

Tabelle 12: PAH-Enzymaktivitäten eukaryot exprimierter PAH

| <i>PAH Mutation</i> | <i>V_{max}</i> |
|---------------------|------------------------|
| | [pmol/min*mg] |
| WT | 17914 ± 1087 |
| p.Phe39Leu | 5196 ± 88 |
| p.Leu48Ser | 3262 ± 246 |
| p.Ile65Thr | 3160 ± 22 |
| p.Arg158Gln | 133 ± 1 |
| p.Arg252Trp | 74 ± 10 |
| p.Arg261Gln | 5938 ± 228 |
| p.Glu280Lys | 94 ± 18 |
| p.Pro281Leu | 121 ± 17 |
| p.Ala300Ser | 5720 ± 285 |
| p.Ser349Pro | 179 ± 12 |
| p.Val388Met | 6574 ± 94 |
| p.Arg408Trp | 110 ± 8 |
| p.Tyr414Cys | 3215 ± 116 |

Die Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

Folgende Mutationen zeigten eine moderate Enzymaktivität bei ~ 30 % im Vergleich zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit des Wildtyps: p.Phe39Leu, p.Arg261Gln, p.Ala300Ser und p.Val388Met (Tabelle 13). p.Val388Met zeigte mit 37 % die höchste Aktivität aller PAH-Varianten.

Die Enzymaktivität von p.Leu48Ser, p.Ile65Thr und Tyr414Cys betrug etwa 18 %.

Die PAH-Proteine p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Pro281Leu, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp zeigten kaum bzw. keine Restaktivität der PAH: ≤ 1 %. Insgesamt zeigten die gleichen PAH-Varianten Enzymaktivitäten > 10 % wie schon bei Endpunktmessungen der prokaryot exprimierten PAH: p.Phe39Leu, p.Leu48Ser, p.Ile65Thr p.Arg261Gln, p.Ala300Ser, p.Val388Met, Tyr414Cys. Die restlichen PAH-Varianten (p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Pro281Leu, p.Ser349Pro, p.Arg408Trp) zeigten wie schon bei den PAH-Enzymaktivitätsmessungen mit rekombinanten PAH-Proteinen kaum Restaktivität.

Tabelle 13: Restenzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp

| <i>PAH</i> Mutation | Enzymaktivität |
|---------------------|----------------|
| | [%] |
| WT | 100 |
| p.Phe39Leu | 29 |
| p.Leu48Ser | 18 |
| p.Ile65Thr | 18 |
| p.Arg158Gln | 1 |
| p.Arg252Trp | 0 |
| p.Arg261Gln | 33 |
| p.Glu280Lys | 1 |
| p.Pro281Leu | 1 |
| p.Ala300Ser | 32 |
| p.Ser349Pro | 1 |
| p.Val388Met | 37 |
| p.Arg408Trp | 1 |
| p.Tyr414Cys | 18 |

Die Enzymaktivität wurde ins Verhältnis zu den V_{\max} -Werten einer WT-PAH gesetzt. Die Werte werden als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

4.4.2 Diskontinuierliche Endpunktmessungen bei doppelter Kofaktor-Konzentration

In einem weiteren Experiment wurden die in 4.4.1 beschriebenen Endpunktmessungen mit dem Einsatz der doppelten Kofaktor-Konzentration durchgeführt. Da BH_4 nicht nur als Kofaktor, sondern auch als pharmakologisches Chaperon fungiert, wurde eine Verbesserung der Aktivität der PAH-Varianten bei überphysiologischen Kofaktor-Konzentrationen vermutet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Insgesamt profitierte hauptsächlich die WT-PAH von der erhöhten Kofaktormenge. Die Aktivitätswerte der PAH-Varianten änderten sich kaum im Vergleich zu den Endpunktmessungen mit einfacher Kofaktor-Konzentration (Tabelle 12). Die Varianten p.Phe39Leu, p.Arg261Gln, p.Ala300Ser und p.Val388Met zeigten, wie bei Endpunktmessungen mit einfacher Kofaktor-Konzentration, moderate Enzymaktivitäten bei ~ 30 % im Vergleich zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit

des Wildtyps. Da die V_{\max} des Wildtyps aber insgesamt höher lag und die Enzymaktivitätsangaben prozentual zum Wildtyp angegeben werden, sind die Werte hier leicht erniedrigt (s. 4.4.1). Die Varianten p.Leu48Ser, p.Ile65Thr und p.Tyr414Cys bewegten sich im Bereich ~16 % verbleibender Enzymaktivität. Die Varianten p.Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Glu280Lys, p.Pro281Leu, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp zeigten kaum bzw. keine Restaktivität der PAH ≤ 1 %.

Tabelle 14: Diskontinuierliche Endpunktmessung transient exprimierter PAH bei doppelter Kofaktormenge

| <i>PAH</i> Mutation | V_{\max} | Restenzymaktivität | Restenzymaktivität mit WT bei einfacher Kofaktor-Konzentration als Referenz |
|---------------------|---------------|--------------------|---|
| | [pmol/min*mg] | [%] | [%] |
| WT | 20146 ± 1334 | 100 | 100 |
| p.Phe39Leu | 4919 ± 883 | 24 | 27 |
| p.Leu48Ser | 3261 ± 443 | 16 | 18 |
| p.Ile65Thr | 3022 ± 35 | 15 | 17 |
| p.Arg158Gln | 151 ± 16 | 1 | 1 |
| p.Arg252Trp | 97 ± 10 | 0 | 1 |
| p.Arg261Gln | 6272 ± 98 | 31 | 35 |
| p.Glu280Lys | 121 ± 29 | 1 | 1 |
| p.Pro281Leu | 104 ± 13 | 1 | 1 |
| p.Ala300Ser | 5645 ± 81 | 28 | 32 |
| p.Ser349Pro | 209 ± 23 | 1 | 1 |
| p.Val388Met | 6579 ± 441 | 33 | 37 |
| p.Arg408trp | 118 ± 12 | 1 | 1 |
| p.Tyr414Cys | 3201 ± 79 | 16 | 18 |

Die Enzymaktivität wurde ins Verhältnis zu den V_{\max} -Werten der WT-PAH gesetzt. Die Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

Zusammenfassend führt eine doppelte Kofaktormenge im standardisierten *activity* assay zu keiner Verbesserung der Enzymaktivitätswerte der PAH-Varianten.

Tabelle 15: Diskontinuierliche Endpunktaktivitätsmessungen transient exprimierter PAH im Vergleich einfache zu doppelter Kofaktormenge

| <i>PAH</i> Mutation | V_{\max} BH_4 [75 μM] ^a | V_{\max} BH_4 [150 μM] ^b |
|---------------------|--|---|
| | [pmol/min*mg] | [pmol/min*mg] |
| WT | 17914 \pm 1087 | 20146 \pm 1334 |
| p.Phe39Leu | 5196 \pm 88 | 4919 \pm 883 |
| p.Leu48Ser | 3262 \pm 246 | 3261 \pm 443 |
| p.Ile65Thr | 3160 \pm 22 | 3022 \pm 35 |
| p.Arg158Gln | 133 \pm 1 | 151 \pm 16 |
| p.Arg252Trp | 74 \pm 10 | 97 \pm 10 |
| p.Arg261Gln | 5938 \pm 228 | 6272 \pm 98 |
| p.Glu280Lys | 94 \pm 18 | 121 \pm 29 |
| p.Pro281Leu | 121 \pm 17 | 104 \pm 13 |
| p.Ala300Ser | 5720 \pm 285 | 5645 \pm 81 |
| p.Ser349Pro | 179 \pm 12 | 209 \pm 23 |
| p.Val388Met | 6574 \pm 94 | 6579 \pm 441 |
| p.Arg408trp | 110 \pm 8 | 118 \pm 12 |
| p.Tyr414Cys | 3215 \pm 116 | 3201 \pm 79 |

^aactivity assay wurde mit einfacher Kofaktor-Konzentration durchgeführt^bactivity assay wurde mit doppelter Kofaktor-Konzentration durchgeführtDie Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

4.5 Analyse PAH-Restproteinmenge nach Expression der *PAH*-Mutationen in Zellkultur

Abbildung 18 A und B verdeutlichen, dass der Wildtyp in löslicher Form, im Vergleich zu den PAH-Varianten und dem unlöslichen Anteil der Wildtyp-Probe, den höchsten Restproteingehalt aufwies. Die Varianten p.Phe39Leu, p.Ile65Thr, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Val388Met und p.Tyr414Cys zeigten ebenfalls mehr Protein im löslichen Anteil als im unlöslichen. Beinahe gleiche Restproteinmengen in löslicher und unlöslicher Form wurden für die Variante p.Leu48Ser nachgewiesen. Erhöhte Mengen unlöslichen Proteins und kleine Mengen löslichen Proteins wurden

für die PAH-Varianten p.Arg158Gln und p.Ser349Pro detektiert. Die Varianten p.Arg252Trp und p.Arg408Trp wiesen kaum bis kein lösliches Restprotein auf. p.Glu280Lys zeigte keine messbare Intensität der Banden.

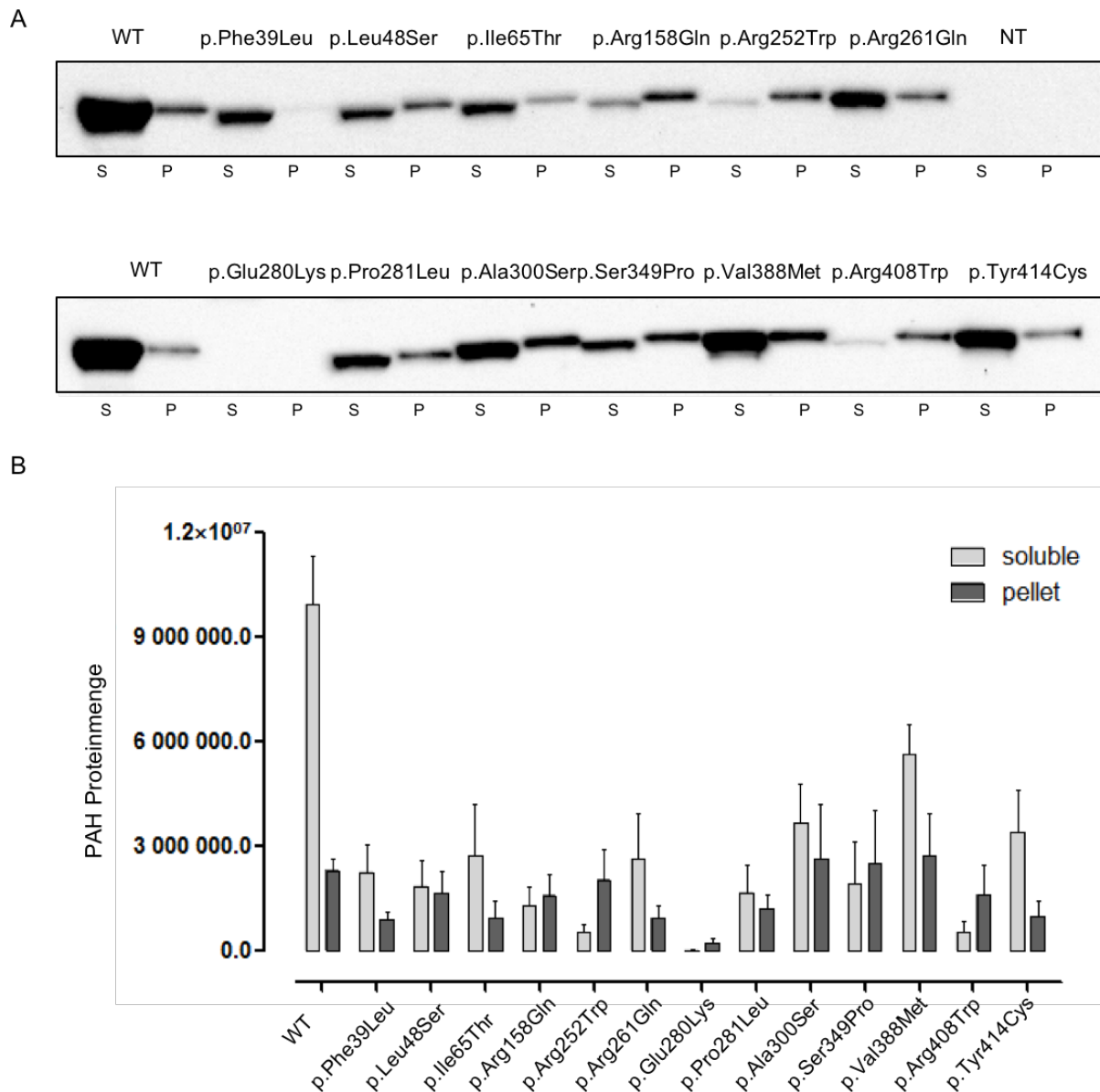


Abbildung 18: Immunoblot und graphische Darstellung der PAH-Proteinmengen

(A) Beispiel eines Immunoblots eukaryot exprimierter WT-PAH, varianter PAH und nicht-transfizierter Zellen (NT). Es wurde je eine Probe mit löslichem Protein (S) und unlöslichem Protein (P) aufgetragen. (B) Graphische Darstellung der PAH-Proteinmengen der löslichen (soluble) und unlöslichen (pellet) Fraktionen. Die Werte (B) werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

In Tabelle 16 werden die PAH-Gesamtproteinmengen zum Proteingehalt des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt. Die PAH-Variante p.Val388Met zeigte eine hohe Proteinmenge (62 % im Vergleich zum Wildtyp). p.Ile65Thr, p.Ala300Ser und p.Tyr414Cys wiesen Proteinmengen von > 30 % auf. Auch für die Varianten p.Phe39Leu, p.Leu48Ser,

p.Pro281Leu, p.Arg261Gln und p.Ser349Pro wurden noch ~ 20 % Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. p.Arg158Gln erreichte eine Gesamtproteinmenge von 14 % im Vergleich zum Wildtyp. p.Arg252Trp, p.Glu280Lys und p.Arg408Trp zeigten kaum bis gar kein Protein.

Tabelle 16: PAH-Gesamtproteinmengen im Verhältnis zum Wildtyp

| PAH Mutation | [%] |
|---------------------|------------|
| WT | 100 |
| p.Phe39Leu | 23 |
| p.Leu48Ser | 20 |
| p.Ile65Thr | 32 |
| p.Arg158Gln | 14 |
| p.Arg252Trp | 6 |
| p.Arg261Gln | 26 |
| p.Glu280Lys | 0 |
| p.Pro281Leu | 19 |
| p.Ala300Ser | 42 |
| p.Ser349Pro | 24 |
| p.Val388Met | 62 |
| p.Arg408Trp | 7 |
| p.Tyr414Cys | 38 |

Die Werte werden als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt

Zusammenfassend wurden bei der Analyse der PAH-Proteinmenge nach Expression der *PAH*-Mutationen in Zellkultur folgende zentrale Beobachtungen gemacht:

- (i) PAH-Varianten, die eine Gesamtproteinmenge ≥ 15 % im Vergleich zum Wildtyp zeigten (p.Phe39Leu, p.Leu48Ser, p.Ile65Thr, p.Arg261Gln, p.Pro281Leu, p.Ala300Ser, p.Val388Met und p.Tyr414Cys.), enthielten mehr Restproteinmenge in löslicher als in unlöslicher Form. Für p.Leu48Ser befand sich die Restproteinmenge zu gleichen Anteilen in der löslichen und unlöslichen Fraktion.
- (ii) Betrag der PAH-Gesamtproteingehalt ≤ 14 % (Arg158Gln, p.Arg252Trp, p.Ser349Pro und p.Arg408Trp), war die Restproteinmenge in der unlöslichen Probe höher als in der löslichen.

- (iii) Die Expression der Mutation p.Glu280Lys führte nicht zur Bildung einer messbaren PAH-Proteinmenge.

4.6 Gruppeneinteilung nach Charakterisierung der 13 PAH-Varianten

Im Folgenden wurden die PAH-Varianten anhand der Ergebnisse in vier Gruppen eingeteilt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersichtstabelle der Gruppeneinteilung nach Charakterisierung der 13 PAH-Varianten

| PAH Mutation | Domäne | Expressionstests | | Oligomerisierung | Restenzymaktivität im Verhältnis zum WT [%] | | Restproteinmenge | | Gr. |
|--------------|------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|---|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----|
| | | PAH Gesamtprotein-gehalt | Anteil lösl. Proteins | | Proka.. Zell-system | Eukary. Zell-system | Totaler Protein-gehalt [%] vom WT | Anteil lösl. Proteins | |
| p.Phe39Leu | Regulatorisch | hoch | hoch | Tetramer/Aggregate | 89 | 29 | 23 | L > U | 1 |
| p.Arg261Gln | Katalytisch | hoch | hoch | Tetramer | 96 | 33 | 26 | L > U | 1 |
| p.Ala300Ser | Katalytisch | moderat | hoch | Tetramer | 79 | 32 | 42 | L > U | 1 |
| p.Val388Met | Katalytisch | hoch | hoch | Tetramer | 98 | 37 | 62 | L > U | 1 |
| p.Leu48Ser | Regulatorisch | moderat | niedrig | Tetramer/Aggregate | 49 | 18 | 20 | L > U | 2 |
| p.Ile65Thr | Regulatorisch | hoch | niedrig | Tetramer/Aggregate | 48 | 18 | 32 | L > U | 2 |
| p.Tyr414Cys | Oligomerisierung | hoch | hoch | Tetramer | 58 | 18 | 38 | L > U | 2 |
| p.Arg158Gln | Katalytisch | moderat | niedrig | Tetramer/Degradation | 4 | 1 | 14 | U > L | 3 |
| p.Pro281Leu | Katalytisch | hoch | hoch | Tetramer | 1 | 1 | 19 | L > U | 3 |
| p.Arg252Trp | Katalytisch | niedrig | niedrig | Degradation | n.m. | 0 | 6 | U > L | 4 |
| p.Glu280Lys | Katalytisch | niedrig | niedrig | Degradation | n.m. | 1 | 0 | n.m. | 4 |
| p.Ser349Pro | Katalytisch | moderat | niedrig | Monomere/Degradation | n.m. | 1 | 24 | U > L | 4 |
| p.Arg408Trp | Oligomerisierung | moderat | niedrig | Degradation | n.m. | 1 | 7 | U > L | 4 |

L: Lösliches Protein, U: Unlösliches Protein

n.m.: nicht messbar, Proka.: prokaryot; eukary.: eukaryot; lösl.: lösliches; Gr.:Gruppe

Gruppe 1: Die PAH-Varianten dieser Gruppe zeigten hohe PAH-Proteinmengen nach prokaryoter Expression, sie ließen sich in tetramerer Form reinigen, sie zeigten hohe spezifische und hohe Rest-Enzymaktivitäten sowie

hohe Restproteinmengen nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen.

Gruppe 2: Diese PAH-Varianten zeigten moderate Proteinmengen nach prokaryoter Expression, die Aufreinigung erfolgte als Tetramer. Sie zeigten nur moderate spezifische und moderate Rest-Enzymaktivitäten, aber hohe Restproteinmengen.

Gruppe 3: Diese PAH-Varianten zeigten moderate bis hohe Proteinmengen nach prokaryoter Expression und das Oligomerisierungsprofil zeigte ein tetrameres Protein nach Affinitätschromatographie. Die PAH-Formen dieser Gruppe wiesen jedoch wenig bis keine Enzymaktivitäten (spezifisch und residual) und niedrige Restproteinmengen nach eukaryoter Expression auf.

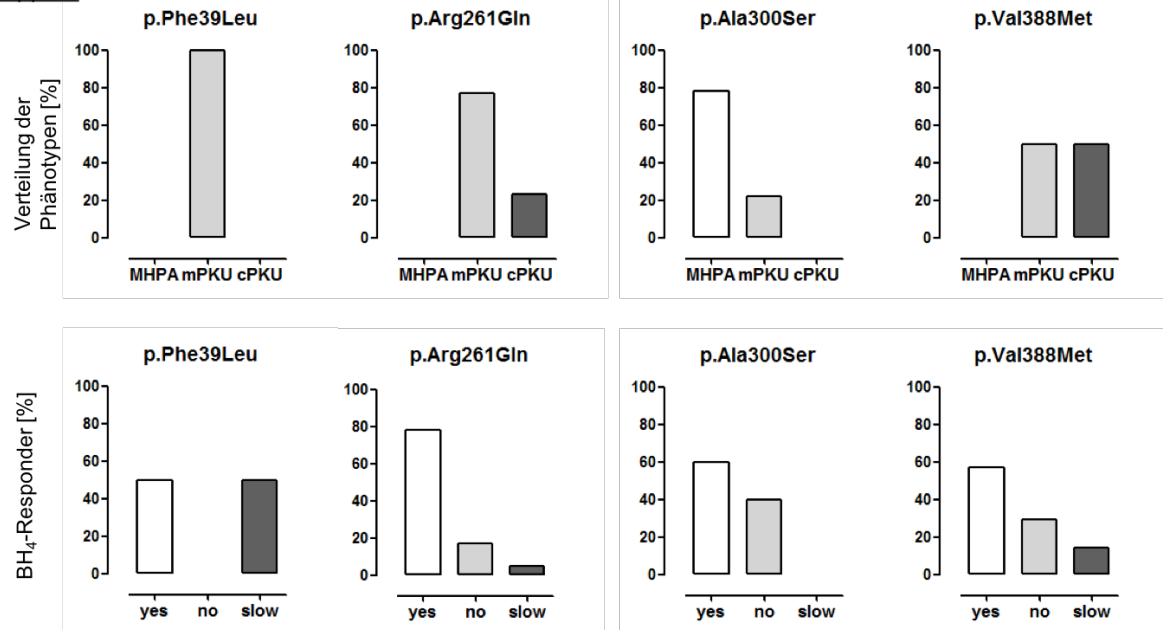
Gruppe 4: Diese Gruppe zeigte kaum Proteingehalt nach prokaryoter Expression und die PAH-Varianten ließen sich nicht in tetramerer Form gewinnen. Die Enzymaktivitäten (spezifisch und residual) waren niedrig bis nicht messbar. Zudem zeigten sie nur geringe bis keine Restproteinmengen.

In einem nächsten Schritt wurde eine Datenbankanalyse (www.biopku.org) durchgeführt, um zu analysieren, mit welchem klinischen Phänotypen die Mutationen der einzelnen in dieser Arbeit herausgearbeiteten Gruppen assoziiert sind.

Die Mutationen der Gruppen 1 und 2 gehen mit einem weiten Spektrum klinischer Phänotypen einher (Abbildung 19). Das bedeutet, dass die klinische Ausprägung bei Vorliegen einzelner *PAH*-Mutationen individuell unterschiedlich ist und eine eindeutige Vorhersage des Phänotyps damit nicht möglich ist.

Die *PAH*-Mutationen p.Phe39Leu und p.Arg261Gln der Gruppe 1 und p.Leu48Ser, p.Ile65Thr und p.Tyr414Cys der Gruppe 2 führen am häufigsten zu mPKU. p.Ala300Ser der Gruppe 1 führt am häufigsten zu MHPA. Die Mutation p.Val388Met führt genauso oft zu mPKU wie zu cPKU.

Gruppe 1



Gruppe 2

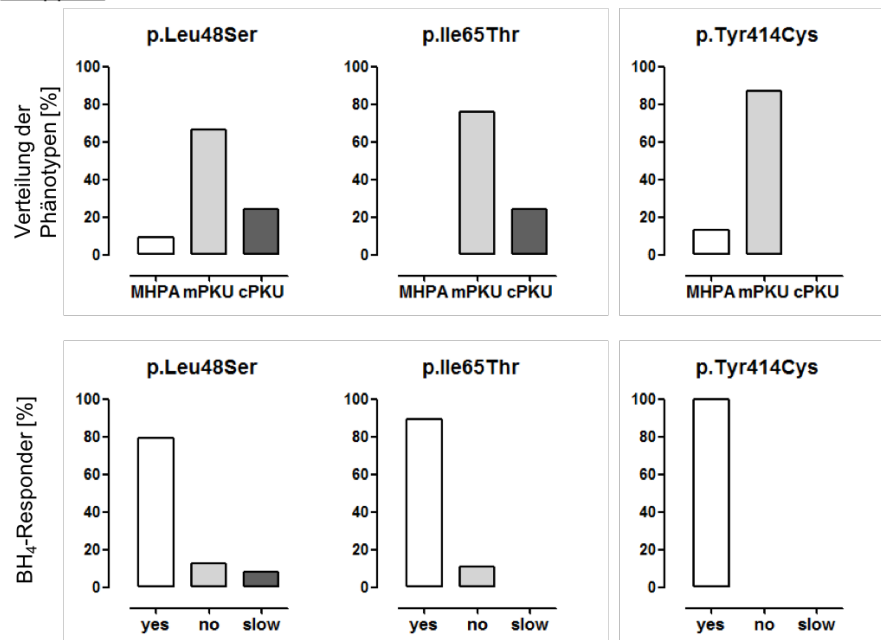


Abbildung 19: Darstellung der genotypspezifischen klinischen Phänotypen und der genotypspezifischen BH₄-Responsivität von Mutationen, die der Gruppe 1 und 2 zugeordnet wurden

MHPA: milde Hyperphenylalaninämie (120-600 $\mu\text{mol/l}$); mPKU: milde Phenylketonurie (600-1200 $\mu\text{mol/l}$); cPKU: klassische Phenylketonurie (> 1200 $\mu\text{mol/l}$).

Die Daten wurden durch Befragung der Datenbank www.biopku.org (05.05.2017) erhoben.

Nur p.Phe39Leu führt ausschließlich zu einem klinischen Phänotyp der mPKU. p.Ala300Ser und p.Tyr414Cys können neben der MHPA auch eine mPKU hervorrufen. p.Val388Met, der Gruppe 1 zugeordnet und die PAH-Variante mit den höchsten Enzymaktivitäten, führt genauso oft zu cPKU wie zu mPKU. Neben mPKU verursachen

auch die Mutationen p.Arg261Gln und p.Ile65Thr eine cPKU. Bei p.Leu48Ser kann die *PAH*-Mutation zu allen drei klinischen Phänotypen der PKU führen.

Auch die BH₄-Responsivität ist bei Vorliegen einzelner *PAH*-Mutationen nicht sicher über den Genotyp vorhersagbar. Patientendaten aus der Datenbank zeigten, dass die *PAH*-Varianten aus den Gruppen 1 und 2 vorwiegend BH₄-responsiv sind (Abbildung 19). Es wurden jedoch auch Fälle beschrieben, in denen Patienten mit dem gleichen Genotyp als BH₄-nicht responsiv verzeichnet wurden. p.Phe39Leu und p.Tyr414Cys sind laut Datenbankanalyse immer BH₄-responsiv, auch wenn die Hälfte der Patienten, die Träger beider Allele von p.Phe39Leu sind, erst spät auf BH₄-Belastung reagiert, als sogenannte *slow*-Responder.

Für jede andere Mutation der Gruppe 1 und 2 wurden Patientenfälle beschrieben, die BH₄-nicht responsiv waren. Für p.Arg261Gln, p.Val388Met und Leu48Ser zeigten sich zusätzlich *slow*-Responder.

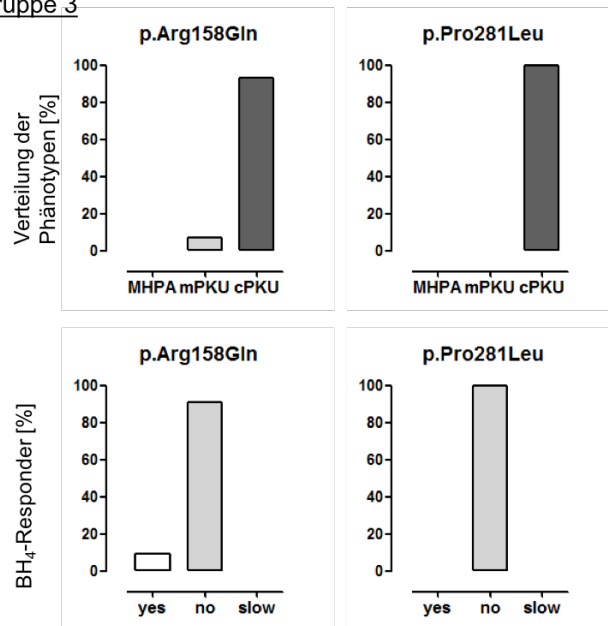
Im Gegensatz zu den Gruppen 1 und 2 sind die *PAH*-Mutationen der Gruppe 3 und 4 fast ausschließlich mit dem klinischen Phänotyp der klassischen PKU assoziiert (Abbildung 20). Es gibt einige wenige Fälle, in denen die *PAH*-Mutationen dieser Gruppen zu einer milden PKU führen (p.158Gln, p.Glu280Lys, p.Arg408Trp). Es wurden keine Patienten beschrieben, bei denen ein Genotyp der Gruppe 3 oder 4 zum klinischen Bild einer MHPA führte.

Somit sind Mutationen der Gruppe 3 trotz Nachweis moderater Proteinmengen nach prokaryoter Expression und Gewinn tetrameren Proteins nach Aufreinigung mit cPKU assoziiert.

Gruppe 4 beinhaltet keine Mutationen, für die Patientenfälle beschrieben wurden, die BH₄-responsiv sind. In der Gruppe 3 wurden Träger der Mutation p.Arg158Gln zu einem kleinen Teil als BH₄-responsiv beschrieben.

Insgesamt zeigen die Gruppen 3 und 4 mit nur wenigen Ausnahmen Assoziationen zum klinischen Phänotyp der klassischen PKU und sind BH₄-nicht responsiv.

Gruppe 3



Gruppe 4

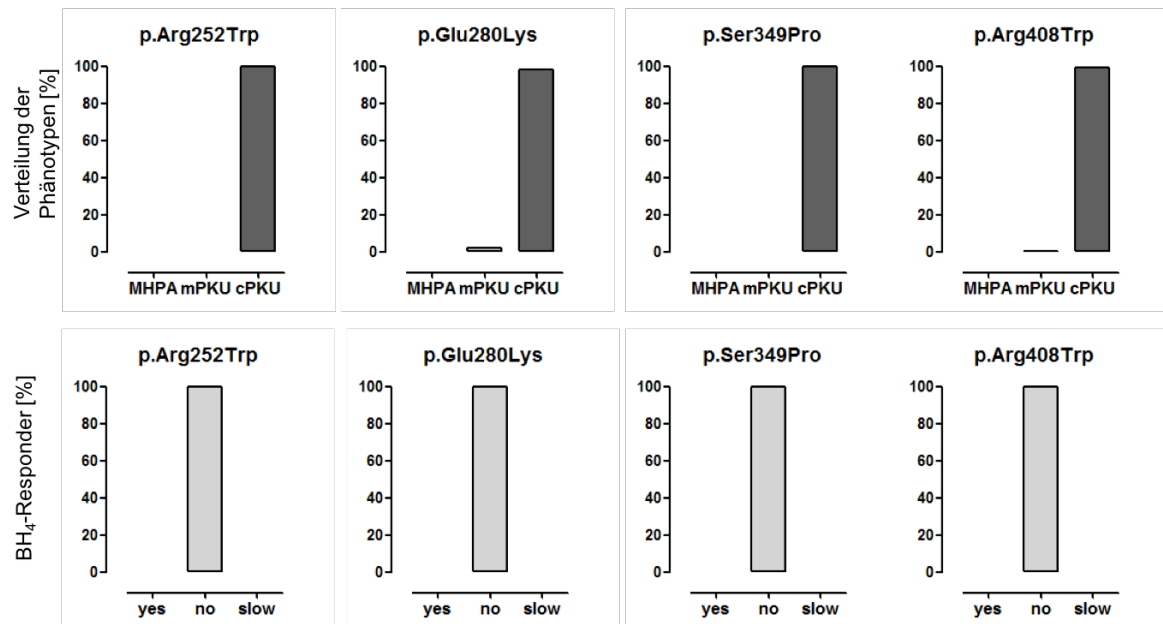


Abbildung 20: Darstellung der genotypspezifischen klinischen Phänotypen und der genotypspezifischen BH₄-Responsivität von Mutationen, die der Gruppe 3 und 4 zugeordnet wurden

MHPA: milde Hyperphenylalaninämie (120-600 $\mu\text{mol/l}$); mPKU: milde Phenylketonurie (600-1200 $\mu\text{mol/l}$); cPKU: klassische Phenylketonurie (> 1200 $\mu\text{mol/l}$)

Die Daten wurden durch Befragung der Datenbank www.biopku.org (05.05.2017) erhoben.

Zusammenfassend kann nach Charakterisierung der 13 PAH-Varianten eine Gruppeneinteilung vorgenommen werden, die folgendes zeigte.

- (i) Die Gruppen 1 und 2 zeigten hohe bis moderate PAH-Proteinmengen nach prokaryoter Expression, sie ließen sich in tetramerer Form reinigen, sie zeigten

- hohe bis moderate (spezifische und residuale) Enzymaktivitäten sowie hohe Restproteinmengen nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen.
- (ii) In Zusammenschau mit der Datenanalyse der genotypspezifischen klinischen Phänotypen zeigten die *PAH*-Mutationen der Gruppe 1 und 2 keine Assoziation zu einem bestimmten Phänotyp, das klinische Spektrum der Ausprägung ist weit. Häufig führen diese *PAH*-Mutationen zu MHPA oder mPKU. Diese *PAH*-Mutationen sind vornehmlich BH₄-responsiv.
 - (iii) Die Gruppen 3 und 4 zeigten keine Enzymaktivitäten (spezifisch und residual) und niedrige bis keine Restproteinmengen nach eukaryoter Expression. Die Gruppe 3 zeigte hohe bis moderate Proteinmengen nach prokaryoter Expression und das Oligomerisierungsprofil zeigte ein tetrameres Protein nach Affinitätschromatographie. Gruppe 4 zeigte kaum Proteingehalt nach prokaryoter Expression und die *PAH*-Varianten ließen sich nicht in tetramerer Form gewinnen.
 - (iv) Insgesamt sind die *PAH*-Varianten der Gruppe 3 und 4 beinahe ausschließlich mit cPKU und zum größten Teil mit BH₄-nicht responsiven Phänotypen assoziiert.

5 DISKUSSION

Die Phenylketonurie gehört zu den häufigsten angeborenen Aminosäurestoffwechselstörungen (Zschocke, 2003, Gersting, 2008) und stellt einen Prototyp der Proteinfaltungserkrankungen dar (Muntau and Gersting, 2010, Underhaug, 2012). Die Enzymaktivität eines substantiellen Anteils von Patienten mit Defekt der PAH kann durch pharmakologische Dosen des Kofaktors BH₄ erhöht, die L-Phe-Konzentration im Blut erniedrigt und damit die Phenylalanintoleranz der Patienten verbessert werden (Kure, 1999, Muntau, 2002, van Spronsen, 2010, Anjema, 2013). Es gibt jedoch auch PAH-Varianten, die nicht BH₄-responsiv sind und deren Mutationsträger weiterhin eine strikte Diät einhalten müssen, um Folgen hoher Phenylalanin-Konzentrationen, wie neurotoxische Schäden, zu vermeiden (Levy, 2007, Williams, 2008, Trefz, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der PAH bei Vorliegen häufiger Mutationen des *PAH*-Gens eingehend untersucht. Es wurden Analysen des fehlfaltungsbedingten Funktionsverlustes mit Bestimmung von Faltungseffizienz und Stabilität der PAH sowie Enzymaktivitätsbestimmungen am gereinigten Protein (spezifische Aktivität) und im eukaryoten Zellsystem (Residualaktivität) durchgeführt. Darüber hinaus wurden die PAH-Restproteinmengen nach transienter Transfektion bestimmt, um den Einfluss der Homöostase der eukaryoten Zellen auf den PAH-Gehalt zu analysieren.

Die PAH-Funktion bestimmt die Höhe der Phenylalaninkonzentration im Blut, welche wiederum ausschlaggebend für die Ausprägung des klinischen Phänotyps ist. Um die genotypspezifischen Arbeitsoptima der PAH-Varianten zu ermitteln, wurde der Einfluss der Substrat- und Kofaktor-Konzentrationen auf die Enzymaktivität in einem großen Spektrum analysiert.

Die 13 ausgewählten, homozygoten PAH-Varianten zeigten im Vergleich zur WT-PAH ohne Ausnahme signifikante Veränderungen in Bezug auf eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften: Faltungseffizienz und/oder Stabilität und/oder Enzymaktivität und/oder Restproteinmenge. Die Veränderungen traten unabhängig von der durch die Mutation beteiligten Enzym-Domäne auf.

Die PAH-Varianten wurden in *E.coli* als Fusionsprotein mit Maltose-bindendem Protein (MBP) exprimiert, das durch Schutz vor Proteolyse die Herstellung von Proteinen in großen Mengen erlaubt (Martinez, 1995, Knappskog, 1996, Waters, 1998). MBP ist zudem die Zielsequenz der Affinitätschromatographie und beeinflusst weder die

Faltung noch die katalytische Aktivität der PAH (Martinez, 1995, Knappskog, 1996, Bjørge, 1998, Pey and Martinez, 2005).

In dieser Arbeit wurden 13 ausgewählte *PAH*-Mutationen umfassend untersucht und charakterisiert, die Ergebnisse führten zu einer Unterteilung der PAH-Varianten in vier Gruppen. Darüber hinaus wurden die genotypspezifischen klinischen Phänotypen und die genotypspezifische BH₄-Responsivität dieser PAH-Varianten in Datenbanken analysiert.

Die *PAH*-Mutationen der Gruppen 1 und 2 zeigten in den Experimenten folgende Eigenschaften: hohe bis moderate PAH-Proteinmengen nach prokaryoter Expression, tetramere Oligomerisierung nach Aufreinigung und hohe bis moderate (spezifische und residuale) Enzymaktivität sowie hohe Restproteinmengen nach transienter Transfektion in COS-7-Zellen.

Datenbankanalysen zeigten, dass die *PAH*-Genmutationen der Gruppen 1 und 2 mit einem weiten Spektrum klinischer Phänotypen assoziiert sind. Dadurch ist der klinische Phänotyp durch den zugrundeliegenden Genotyp nicht vorherzusagen. Auch ein direkter Rückschluss von *in vitro* Analysen auf den klinischen Phänotyp ist nur eingeschränkt möglich. So zeigten z.B. die PAH-Varianten der Gruppe 1 hohe Aktivität, aber nur eine der vier Mutationsformen (p.Ala300Ser) führt laut Datenanalyse am häufigsten zur Ausprägung des mildesten klinischen Phänotyps (MHPA). Die Variante p.Val388Met, die die höchste Enzymaktivität aufwies, führt sogar häufig zu klassischer Phenylketonurie. Die zweite Gruppe wies weniger hohe Enzymaktivitäten auf, die Mutationen der Gruppe 2 führen am häufigsten zu mPKU. Insgesamt weist der Vergleich der Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen und der Datenbankanalysen jedoch darauf hin, dass Mutationsvarianten mit einer Restaktivität $\geq 18\%$ am häufigsten zu milder PKU führen.

Weiterhin sind die PAH-Varianten der Gruppe 1 und 2 am häufigsten mit BH₄-Responsivität assoziiert. Es wurden jedoch auch Patientenfälle beschrieben, bei denen die PAH-Varianten als nicht-BH₄-responsiv klassifiziert wurden.

Es ist zu berücksichtigen, dass diese Inkonsistenz der Klassifizierung der BH₄-Responsivität der *PAH*-Mutationen unter anderem durch unterschiedliche Ausführungen der BH₄-Belastungstests bedingt sein könnte (Blau, 2008, Blau, 2009, Heintz, 2013). Leuders und Wolfgart *et al.* konnten z.B. durch verlängerte Testbedingungen (10 mg/kg/d Sapropterin für eine Woche und 20 mg/kg/d für weitere sechs Wochen) zuvor falsch-positiv getestete Patienten identifizieren (Leuders and Wolfgart, 2013). Sie vermuteten, dass die niedrigeren Phe-Konzentrationen im Blut

während des Belastungstests, der zuvor als BH₄-responsiv eingestuften Patienten, aufgrund von zufälligen Schwankungen aufgetreten seien und nicht durch die BH₄-Belastung bedingt waren (Leuders and Wolfgart, 2013). Verlängerte Tests konnten zudem sogenannte *slow responder* oder langsam-responsive aufdecken (Blau, 2008), also Patienten, die zuvor fälschlicherweise als BH₄-nicht responsiv eingestuft wurden. Bisher wurde davon ausgegangen, dass eine spezifische PAH-Aktivität > 30 % mit dem phänotypischen Merkmal der BH₄-Responsivität korreliert (Erlandsen and Pey, 2004, Aguado, 2007, Dobrowolski, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir durch Durchführung eines umfassenden experimentellen Programms weitere Kriterien zur Vorhersage der BH₄-Responsivität herausarbeiten. Diese Daten zeigen, dass eine spezifische PAH-Aktivität > 47 %, eine PAH-Restaktivität in Zellkultur > 17 % und eine Restproteinmenge > 20 % im eukaryoten System sehr häufig mit dem klinischen Merkmal der BH₄-Responsivität assoziiert sind.

Im Gegensatz dazu zeigten die PAH-Varianten der Gruppe 3 nach prokaryoter Expression hohe bis moderate Proteinmengen und das Oligomerisierungsprofil zeigte ein tetrameres Protein nach Affinitätschromatographie. Die Gruppe 4 wies kaum Proteinmengen nach prokaryoter Expression auf und die PAH-Varianten ließen sich nicht in tetramerer Form gewinnen. Die PAH-Varianten der Gruppen 3 und 4 zeigten wenig bis keine Enzymaktivität (spezifisch und residual) und niedrige, in Gruppe 4 z.T. nicht messbare, Restproteinmengen nach eukaryoter Expression. Der Vergleich der Datenbankanalysen der genotypspezifischen Daten des klinischen Phänotyps und der BH₄-Responsivität zeigte, dass die *PAH*-Mutationen der Gruppe 3 und 4 beinahe ausschließlich mit klassischer PKU assoziiert und nicht-BH₄-responsiv sind.

Trotz der hohen bis moderaten Proteinmengen und Gewinnung tetrameren Proteins nach Aufreinigung nach prokaryoter Expression der *in vitro*-Analysen der PAH-Varianten der Gruppe 3 führen diese *PAH*-Mutationen zur gleichen klinischen Ausprägung wie die der Gruppe 4, bei denen kein tetrameres Protein nachgewiesen werden konnte. Die PAH-Varianten der Gruppe 3 können sich zwar zur funktionalen Oligomerisierung eines Tetramers falten, sind aber katalytisch nur eingeschränkt funktionsfähig. So zeigten p.Pro281Leu und p.Arg158Gln der dritten Gruppe, die beide in der katalytischen Domäne lokalisiert sind, kaum bis keine Enzymaktivität.

Durch die Mutation p.Pro281Leu wird Prolin durch Leucin substituiert, wodurch Konformationsänderungen im aktiven Zentrum verursacht werden (Erlandsen and Stevens, 1999). Dies führt zu nahezu vollständigem spezifischen Aktivitätsverlust (Dworniczak, 1991) und Restaktivitätsverlust (Okano, 1991) (Tabelle 17). Der

Aminosäure-Rest Arg158 bildet eine Salzbrücke zu Glu280 und eine Wasserstoffbrücke zu Tyr268, die die Form des aktiven Zentrums beeinflussen (Erlandsen and Stevens, 1999). Der Austausch des Arginins durch Glutamin verursacht eine strukturelle Veränderung (Erlandsen and Stevens, 1999), die die Enzymaktivität auf ~ 10% (Okano, 1990, Waters, 1998) reduziert (Tabelle 17). Der mutationsbedingte Aminosäureaustausch verhindert in den o.g. Fällen zwar nicht die Faltung zum Tetramer, es resultiert jedoch eine Fehlfaltung, die das aktive Zentrum beeinflusst und dadurch zum Funktionsverlust führt. Die PAH-Varianten der Gruppe 3 zeigten, dass durch die *PAH*-Genmutation im Protein Aminosäure-Interaktionen beeinflusst werden, die zu einem Defekt der Enzymstruktur führen und die katalytische Funktion einschränken.

Die PAH-Varianten der Gruppe 4 zeigten eine Oligomerisierungsstörung sowie Degradation und Aggregation (Waters, 1998, Waters, 2000, Erlandsen and Pey, 2004, Pey, 2007, Gersting, 2008). Diese *PAH*-Genotypen kodieren für PAH, deren Funktionsverlust durch nahezu vollständigen Proteinverlust verursacht wird. Bis auf p.Ser349Pro zeigten die PAH-Varianten der Gruppe 4 kaum bis keine Restproteinmengen. Da die PAH-Restproteinmenge mit dem Niveau der Enzymaktivität korreliert (Pey, 2003) sind diese PAH-Varianten fast ausschließlich mit klassischer PKU assoziiert (Abbildung 20). Die PAH-Varianten der Gruppe 4 waren in den Experimenten dieser Arbeit faltungsineffizient, zeigten kein tetrameres Protein nach Aufreinigung und erreichten nicht den Status des funktionalen Proteins. Ohne lösliches Enzym kann BH₄ nicht als stabilisierendes Chaperon fungieren (Erlandsen and Pey, 2004). Somit wurden auch in genotypspezifischen Datenbankanalysen die meisten Patienten als nicht-BH₄-responsiv eingestuft (Abbildung 20). Jedoch zeigten p.Ser349Pro der Gruppe 4 und die PAH-Varianten der Gruppe 3 zwar verringerte Restproteinmengen im Vergleich zum Wildtyp, aber es konnte auch in geringen Mengen lösliches und damit funktionales Protein gewonnen werden. Diese drei Varianten bieten damit vielleicht Potential für BH₄-Responsivität, die z.B. durch verlängerte BH₄-Belastungstestbedingungen (Leuders and Wolfgart, 2013) nachgewiesen werden könnte.

Im Gegensatz dazu wurde für p.Glu280Lys der Gruppe 4 fast keine Restproteinmenge gemessen (so auch (Pey, 2003)). Die Ergebnisse zeigten, diese PAH-Variante ist faltungsineffizient und instabil und führt zu komplettem Proteinverlust durch Degradation. Die Mutation ist im aktiven Zentrum des Proteins lokalisiert und

verändert, durch die Substitution einer der zwei freien, geladenen Glutaminsäuren, das elektrostatische Potential drastisch (Erlandsen and Stevens, 1999).

Die PAH-Varianten p.Arg252Trp und p.Arg408Trp der Gruppe 4 zeigten vor allem unlösliche Restproteinmengen. p.Arg408Gln, eine sehr häufige Mutation (Zschocke, 2003), führt zu schwerer Fehlfaltung und struktureller Degradation (Pey, 2003). Diese Mutation führt fast immer zu einer klassischen PKU (Eisensmith and Woo, 1992, Erlandsen and Stevens, 1999, Gjetting, 2001, Pey, 2003, Zschocke, 2003, Zurflüh, 2008, Dobrowolski, 2009) (Abbildung 20). Die strukturelle Schädigung durch die PAH-Mutationen p.Arg252Trp und p.Arg408Trp führt zu Aggregation, die den Funktionsverlust der PAH-Varianten bedingt (Gjetting, 2001, Gersting, 2010).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Experimente und der Vergleich mit Datenbankanalysen darauf hin, dass eine spezifische Enzymaktivität der PAH < 5 % bzw. eine Residualaktivität < 2 % beinahe ausschließlich zu klassischer Phenylketonurie ohne BH₄-Responsivität führt. Restproteinmengen > 14 % vor allem, wenn lösliches Protein nachgewiesen werden kann, könnten Potential für verlängerte BH₄-Belastungstests bieten.

Weiterhin zeigten alle PAH-Varianten der Gruppen 1-4 eine verringerte Residualaktivität im Vergleich zur spezifischen Enzymaktivität. Proteinefehlfaltung führt in eukaryoten Zellen zu vermehrter intrazellulärer Proteolyse (Björge, 1998, Gjetting, 2001, Goldberg, 2003, Welch, 2004). Zudem können durch den strukturellen Defekt hydrophobe Aminosäurenreste exponiert werden, die zu Aggregation führen (wie z.B. für p.Arg408Gln), die wiederum zu einer Degradation durch Proteasome bedingt (Goldberg, 2003, Welch, 2004, Kim, 2013, Muntau, 2014). Der vermehrte Enzymabbau führt zu verringerten Restproteinmengen, die sich in erniedrigten Enzymaktivitäten im Vergleich zum Wildtyp widerspiegelt. Die Analysen der Residualaktivität und der Restproteinmengen im eukaryoten Zellsystem zeigten, dass, im Gegensatz zum Wildtyp, die Expression der PAH im zellulären Umfeld zu Degradation der PAH-Varianten und damit zu geringerer katalytischer Effizienz im Vergleich zu prokaryot exprimierter PAH führt.

Insgesamt bestätigten die Daten dieser Arbeit, dass *PAH missense* Mutationen über Fehlfaltung zum Funktionsverlust führen (Pey, 2007, Gersting, 2008).

Durch die Einteilung der PAH-Varianten nach umfassenden Funktionsanalysen in vier Gruppen und dem Vergleich genotypspezifischer Datenbankanalysen kann folgendes festgehalten werden:

- (i) Eine spezifische Enzymaktivität < 5 % und eine Residualaktivität < 2 % führt beinahe immer zu klassischer PKU ohne BH₄-Responsivität.
- (ii) Restproteinmengen korrelieren mit der Höhe der Enzymaktivität. p.Arg158Gln, p.Pro281Leu und p.Ser349Pro zeigten Restproteinmengen > 14 % mit anteiligem löslichen Protein und könnten von verlängerten BH₄-Belastungstests profitieren.
- (iii) Bewirkt die *PAH*-Genmutation nicht einen vollständigen Strukturverlust der PAH-Variante, kann durch einen Chaperon-Effekt das vulnerable und faltungsineffiziente Protein durch seinen Kofaktor BH₄ vor Fehlfaltung geschützt werden (Muntau and Gersting, 2010, Kim, 2013, Muntau, 2014). Die Untersuchungen zeigten, dass bei Restproteinmengen > 20 % und hohen Enzymaktivitäten *in vitro* eine klinische BH₄-Responsivität sehr wahrscheinlich ist.

Die Enzymaktivitätsmessungen der spezifischen und residualen Aktivität wurden mit standardisierten PAH *activity assays* und damit bei festgelegten Substrat- und Kofaktor-konzentrationen durchgeführt. Die Durchführung der PAH-Enzym *activity assays* (Martinez, 1995, Miranda, 2002) erfolgte nach einem modifizierten, etablierten, standardisierten Protokoll (Gersting, 2008, Gersting, 2010, Gersting and Staudigl, 2010, Staudigl and Gersting, 2011).

In dieser Arbeit wurden zusätzlich PAH *activity landscapes* erstellt, die genotypspezifische Daten liefern könnten, die den Einfluss des metabolischen Status widerspiegeln. Die PAH *activity landscapes* wurden mit Hilfe einer kontinuierlichen Messung durchgeführt (Gersting and Staudigl, 2010, Staudigl and Gersting, 2011, Danecka, 2015).

Der metabolische Status beeinflusst die Enzymaktivität entscheidend, da die PAH durch sein Substrat aktiviert wird (Shiman, 1980, Kaufman and Mason, 1982, Knappskog, 1996, Kobe, 1999, Jennings, 2001, Gersting and Staudigl, 2010, Fitzpatrick, 2012, Underhaug, 2012). Die Phenylalaninkonzentrationen in der Leber fluktuieren physiologisch (Staudigl and Gersting, 2011, Clearly, 2013, Danecka, 2015) und verändern das Verhältnis L-Phe/BH₄. Diese Ratio wird ebenfalls durch therapeutische Kofaktor-Gaben beeinflusst (Staudigl and Gersting, 2011, Danecka, 2015). Die Bindung des Kofaktors führt zur Bildung eines inaktiven PAH-BH₄-Komplexes (Jennings, 2001, Gersting and Staudigl, 2010, Underhaug, 2012, Heintz, 2013). Somit sind die Aktivität und auch die Inhibition des Enzyms von der

Konzentration des Substrats und des Kofaktors abhängig. Umgekehrt werden aber die Konzentrationen von Phenylalanin und BH₄ auch von der Aktivität des Enzyms beeinflusst. Ist also die Aktivität des Enzyms durch eine Mutation verändert, kann diese durch exogenes Eingreifen beeinflusst werden, zum Beispiel durch zusätzliche pharmakologische BH₄-Dosen. Auch die Phe-Restriktion, die vor allem eingesetzt wird, um die Serumkonzentration der Aminosäure niedrig zu halten und um Folgeschäden zu minimieren, verändert den metabolischen Status und damit vermutlich auch die Enzymaktivität.

Den Einfluss eines breiten Spektrums von Substrat- und Kofaktor-Konzentration auf die PAH-Enzymaktivität wurde durch die Anfertigung von PAH *activity landscapes* analysiert. Die Auswertung der *activity landscapes* zeigte, dass die Arbeitsoptima der Enzymaktivität der PAH-Varianten bei anderen Substrat- und Kofaktor-Konzentrationen liegen als die des Wildtyps.

Analysiert wurden die PAH-Varianten, die als Tetramer aufgereinigt werden konnten, dies sind alle PAH der Gruppe 1, 2 und 3. Sie zeigten in den Datenbankanalysen des genotypspezifischen klinischen Phänotyps eine große Varianz in der Ausprägung des klinischen Phänotyps und Variabilität bezüglich der BH₄-Responsivität. Ein Grund dafür könnte z.B. ein unterschiedlicher metabolischer Status der Patienten bei Zuordnung zu ihrem klinischen Phänotyp bzw. während des BH₄-Belastungstest sein. In den *activity landscapes* der PAH-Varianten p.Leu48Ser, p.Arg261Gln, p.Val388Met und p.Tyr414Cys wurden verbreiterte PAH-Arbeitsoptima im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. p.Val388Met und p.Tyr414Cys zeigten nach Abfall der Enzymaktivität bei steigenden Substratkonzentrationen einen erneuten Anstieg der Aktivität bei höheren Substratkonzentrationen (~ 2200 µM L-Phe). Darüber hinaus wurde für p.Arg261Gln eine Rechtsverschiebung und damit also eine erniedrigte Substrataffinität, heißt ein PAH-Arbeitsoptimum bei höheren Substratkonzentrationen als beim Wildtyp, nachgewiesen. Auch p.Leu48Ser erreichte die höchste Reaktionsgeschwindigkeit erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen (~ 1000 µM L-Phe) im Vergleich zum Wildtyp (~ 460 µM L-Phe).

Die Ausprägungen der klinischen Phänotypen und der BH₄-Responsivität der PAH-Varianten p.Leu48Ser, p.Arg261Gln p.Val388Met und p.Tyr414Cys sind sehr variabel (Leuzzi, 2006, Zurflüh, 2008, Staudigl and Gersting, 2011, Danecka, 2015, www.biopku.org) und ihr phänotypisches Spektrum breit gefächert. Schlussfolgernd ist zu vermuten, dass in Zusammenschau der experimentellen und klinischen Daten, ein

unterschiedlicher metabolischer Status der Patienten bei Zuordnung zum klinischen Phänotyp ausschlaggebend für die Variabilität der Ausprägungen sein könnte.

Darüber hinaus könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass PAH-Varianten, deren Substratbedarf erhöht bzw. deren Substrataffinität erniedrigt ist (Rechtsverschiebung) durch die therapeutische Senkung der Substratkonzentration im Blut für PKU-Patienten auf $< 360 \mu\text{M}$ L-Phe (Blau, 2009, Mitchell, 2011, Vockley, 2014) in ihrer Funktion eingeschränkt werden könnten (Danecka, 2015). Die Rechtsverschiebung in PAH *activity landscape* Analysen gibt Grund zur Annahme, dass die L-Phe-Toleranz dieser Patienten bei höheren Substratkonzentrationen steigt und sich eine Lockerung der Diät positiv auswirken könnte (Staudigl and Gersting, 2011, Danecka, 2015). Diese Annahmen sollten durch nachfolgende Studien belegt werden.

Für die PAH-Varianten p.Ile65Thr und p.Ala300Ser lagen die PAH-Arbeitsoptima der Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp in einem engeren Feld von Substrat- und Kofaktor-Konzentrationen. Die Enzymaktivität der PAH-Variante p.Ile65Thr sank schon bei Substratkonzentrationen $> 675 \mu\text{M}$ ab, die Enzymaktivität des Wildtyps war erst ab $\sim 1400 \mu\text{M}$ L-Phe rückläufig. Für PKU-Patienten mit dieser PAH-Mutation könnte vermutet werden, dass die restriktive Phenylalanin-arme Diät für eine optimale PAH-Enzymaktivität streng eingehalten werden sollte.

Die PAH-Varianten p.Pro281Leu und p.Arg158Gln zeigten keinen klar definierten Aktivitätspeak. Die geringe maximale Reaktionsgeschwindigkeit für p.Arg158Gln bestand nur bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen. In Datenbankanalysen waren die PAH-Varianten p.Arg158Gln und p.Pro281Leu mit cPKU ohne BH₄-Responsivität assoziiert.

Ob eine Variante BH₄-responsiv ist, ist z.T. ebenfalls vom metabolischen Status abhängig (Gersting and Staudigl, 2010), denn nur bei ausreichend hohen L-Phe-Konzentrationen z.B. für den Wildtyp ($> 120 \mu\text{M}$) ist die PAH aktiviert und kann durch BH₄ unterstützt werden (Danecka, 2015). Die Daten der PAH *activity landscapes* zeigen, dass sich der Kofaktorbedarf bei steigenden Substratkonzentrationen erhöht, um dieselbe Enzymaktivität aufrechtzuerhalten. Dies wurde auch von Staudigl und Gersting *et al* 2011 und Danecka *et al* 2015 beschrieben.

Die genotypspezifische Datenbankanalyse der BH₄-Responsivität zeigte, dass für die PAH-Variante p.Leu48Ser BH₄-responsive, BH₄-nicht responsive und *slow-Responder* beschrieben wurden (www.biopku.org). Diese Variabilität ist vermutlich durch verschiedene BH₄-Belastungstest-Durchführungen und damit ggf. unterschiedliche Ergebnissen und andererseits durch den unterschiedlichen metabolischen Status bei

Durchführung des BH₄-Belastungstests beeinflusst. Verlängerte BH₄-Belastungstests führen zu Akkumulation des Kofaktors in den Zellen, der einen erhöhten Bedarf der PAH-Variante decken könnte (Danecka, 2015). Die Daten dieser Arbeit zeigten aber auch, dass die maximale Enzymaktivität der Variante p.Leu48Ser *in vitro* erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen (1043 µM) auftritt. Es wäre zu vermuten, dass der metabolische Status der Substratkonzentration beim BH₄-Belastungstest einen Einfluss auf die PAH-Enzymaktivität und damit letztlich auf die Senkung der L-Phe-Plasmakonzentration hat.

Weiterhin konnten die Daten dieser Arbeit einen Einfluss des metabolischen Status auf die BH₄-Responsivität für die Mutation p.Ile65Thr bestätigen. Staudigl und Gersting *et al* vermuteten, nach klinischen BH₄-Belastungstests, dass Konzentrationen höher als 750 µM L-Phe für p.Ile65Thr zu falsch-negativen Ergebnissen führt (Staudigl and Gersting, 2011). Die experimentellen Daten der *activity landscapes* zeigen, dass die Enzymaktivität dieser PAH-Variante schon bei weniger als 675 µM Substratkonzentration unter 50 % fällt und damit die o.g. Hypothese weiter stützten. Die Vergleiche der Datenbankanalysen und der PAH *activity landscapes* Experimente zeigen zusammengefasst folgendes.

- (i) Ein Verlust des Enzymaktivitätspeaks in PAH *activity landscape* Analysen und Verlust der *landscape*-Architektur ist mit cPKU ohne BH₄-Responsivität assoziiert.
- (ii) Der metabolische Status hat einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität der PAH-Varianten *in vitro* und damit letztlich wahrscheinlich auch auf den klinischen Phänotyp und die BH₄-Responsivität.
- (iii) Bei PAH-Varianten mit klar definiertem PAH-Arbeitsoptimum kann durch Vergleiche mit Datenbankanalysen der klinische Phänotyp nicht vorhergesagt werden.

Es ist zu vermuten, dass das PAH-Enzym in seinem individuellen Arbeitsoptimum, das meist nicht dem des Wildtyps entspricht und somit auch nicht den therapeutischen Vorgaben der Substratkonzentration, höhere Enzymaktivitäten erreichen könnte und letztlich die L-Phe-Toleranz des Patienten anders sein könnte als angenommen.

Wie für p.Leu48Ser und Ile65Thr beschrieben, ist der metabolische Status auch bei BH₄-Belastungstests und der Einteilung als BH₄-responsiv und BH₄-nicht responsiv zu berücksichtigen. Diese Annahmen sollten in klinischen Studien verifiziert werden.

Insgesamt ist es wahrscheinlich, dass Patienten mit PAH-Varianten die im *activity landscape* eine Linksverschiebung zeigten, mit einer strikten Diät eingestellt werden

sollten. Für Mutationsformen mit rechtsverschobenen Aktivitätsoptima könnte in klinischen Tests untersucht werden, ob höhere Substratkonzentrationen ($> 360 \mu\text{mol/l}$) im Blut zu einem überproportionalen Anstieg der L-Phe-Toleranz führen (Danecka, 2015). Ähnlich könnte das für Varianten mit verbreitertem Arbeitsoptimum geschehen, da hier evtl. eine Lockerung der Diät ohne Toleranzverlust möglich sein könnte.

Zusammenfassend ist die BH_4 -Responsivität bei PAH-Varianten abhängig von der Restaktivität und von der Restproteinmenge. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass PAH-Varianten, die in Funktionsanalysen eine spezifische Enzymaktivität $< 5 \%$, Restproteinmengen $< 10 \%$ und in PAH *activity landscapes* kein definiertes Arbeitsoptimum zeigen, beinahe ausschließlich mit cPKU assoziiert und nicht- BH_4 -responsiv sind.

Steigende Restproteinmengen, steigende spezifische Enzymaktivitäten und klar definierte Arbeitsoptima im *activity landscape* sind Voraussetzung für BH_4 -Responsivität, führen jedoch nicht zwingend zu BH_4 -Responsivität. Mit steigenden Restproteinmengen steigt auch die Variabilität der klinischen Phänotypen in genotypspezifischen Datenbankanalysen. Restproteinmengen $> 20 \%$ sind häufig mit BH_4 -Responsivität und mPKU assoziiert.

Da die Daten dieser Arbeit vermuten lassen, dass der metabolische Status einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der BH_4 -Belastungstests hat, sollten, um die Genotyp/Phänotyp-Korrelation besser zu verstehen, einheitliche und vermutlich auch verlängerte BH_4 -Belastungstests eingeführt werden, die zudem die L-Phe-Konzentration der Patienten bei Testbeginn berücksichtigen. Unter Berücksichtigung des metabolischen Status der Substratkonzentration bei Belastungstests könnten zusätzliche genotypspezifische Daten der PAH-Varianten im metabolischen Umfeld gesammelt werden und in weiteren Studien mit *in vitro* Funktionsanalysen verglichen werden. Letztlich könnten sie zu einem klareren Bild der Genotyp/Phänotyp-Korrelation führen. Daraus könnten Therapieschemata entwickelt werden, die auf den Genotyp des Patienten zugeschnitten wären und eine individualisierte Therapie weiter verbessern würden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Phenylketonurie (PKU) ist die häufigste genetisch bedingte Aminosäurestoffwechselstörung, die durch einen Defekt der Phenylalaninhydroxylase (PAH) verursacht wird. Zugrunde liegen Mutationen im *PAH*-Gen, die häufig zu einem fehlfaltungsbedingten Funktionsverlust des Enzyms führen. Hierdurch wird der Abbau der essentiellen Aminosäure Phenylalanin (L-Phe) eingeschränkt und es entsteht eine Hyperphenylalaninämie, die ohne Behandlung zu schwerer mentaler Retardierung führt. Die Behandlung erfolgt durch eine restriktive L-Phe-arme Diät. Zudem können pharmakologische Dosen des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH_4) bei Trägern bestimmter *PAH*-Mutationen die Phenylalaninkonzentration im Blut senken und die L-Phe-Toleranz verbessern. BH_4 wirkt hierbei als pharmakologisches Chaperon. Ein BH_4 -Belastungstest nach Diagnosestellung gibt Aufschluss über die Responsivität des Patienten. Genotypspezifische Vorhersagen der BH_4 -Responsivität und der Ausprägung des klinischen Phänotyps sind jedoch durch *PAH*-Datenbankanalysen nur eingeschränkt möglich.

In dieser Arbeit wurden Funktionsanalysen varianter *PAH*-Proteine bei häufigen humanen Mutationen des *PAH*-Gens durchgeführt, um das Verständnis zu den Ursachen des fehlfaltungsbedingten Funktionsverlustes zu vertiefen. Hierfür wurde eine cDNS-Bibliothek der 13 häufigsten *missense* Mutationen im *PAH*-Gen erstellt. Prokaryot exprimierte *PAH*-Varianten wurden hinsichtlich ihres molekularen Mechanismus der Fehlfaltung und des Einflusses der Mutation auf die spezifische Enzymaktivität in einem standardisierten diskontinuierlichen *PAH activity assay* im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Darüber hinaus wurden die Residualenzymaktivität und die Restproteinmenge im eukaryoten Zellsystem untersucht.

Die *PAH*-Varianten wurden auf der Basis der experimentellen Ergebnisse in Gruppen unterteilt, die mit genotypspezifischen Datenbankanalysen der klinischen Phänotypen und der BH_4 -Responsivität verglichen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass (1) faltungsineffiziente und instabile *PAH*-Varianten zu Proteinaggregation und –degradation und damit zu niedrigeren Restproteinmengen führen; (2) *PAH*-Varianten mit einer Restproteinmenge < 10 % und einer spezifischen Enzymaktivität < 5 % beinahe ausschließlich mit klassischer PKU assoziiert und nicht BH_4 -responsiv sind; (3) steigende Restproteinmengen und steigende spezifische Enzymaktivitäten Voraussetzung aber keine Garantie für BH_4 -Responsivität sind; und (4) mit steigenden

Restproteinmengen die Variabilität des klinischen Phänotyps steigt und Restproteinmengen > 20 % häufig mit BH₄-Responsivität und milder PKU assoziiert sind.

Zusätzlich sollte der Zusammenhang zwischen dem metabolischen Status und der residualen Enzymfunktion varianter PAH-Varianten bei Vorliegen homozygoter *PAH*-Genotypen untersucht werden. Prokaryot exprimierte PAH wurde in Abhängigkeit von Substrat- und Kofaktor-Konzentrationen in einer kontinuierlichen, Fluoreszenz-basierenden Echtzeit Messung ermittelt und in einen farbcodierten PAH *activity landscape* überführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass (1) die PAH-Arbeitsoptima der Varianten in Bezug auf Substrat- und Kofaktor-Konzentration sich vom Wildtyp individuell unterscheiden; (2) der metabolische Status einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität der PAH-Varianten *in vitro* und damit wahrscheinlich auch auf den klinischen Phänotyp hat; und (3) der BH₄-Bedarf der PAH bei steigenden Substratkonzentrationen steigt. Diese Ergebnisse rechtfertigen die Hypothese, dass der metabolische Status auch Einfluss auf die klinische BH₄-Responsivität und damit auf die pharmakologische Wirkung des Kofaktors hat.

Zusammenfassend haben die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen experimentellen Daten eine direkte Bedeutung für das klinische Management von PKU-Patienten. Der systematische Einsatz der hier erhobenen Funktionsdaten und von PAH *activity landscapes* zur genotypspezifischen Beurteilung des Arbeitsoptimums des dem Patienten zur Verfügung stehenden Enzyms haben zu einem vertieften Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei PKU geführt. Hierdurch konnten relevante neue Instrumente für die individualisierte, genotypspezifische Therapie von PKU-Patienten etabliert und in der klinischen Routine zur Anwendung gebracht werden.

7 DANKSAGUNG

Mein besonderer und außerordentlicher Dank gilt Prof. Dr. Ania Carolina Muntau für die Möglichkeit ein Mitglied der Forschungsgruppe der molekularen Pädiatrie am Klinikum der Universität München sein zu dürfen. Ebenso bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die unermüdliche Geduld, die konstruktive Kritik, ihre Ausdauer und jedwede Unterstützung, die sie mir bei der Erstellung dieser Arbeit zuteilwerden ließ.

Großer Dank gilt auch Dr. Søren Gersting für viele hilfreiche Anregungen und wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Außerdem gebührt mein Dank Dr. Michael Staudigl für die Durchsicht und die in jeder Hinsicht intensive Unterstützung während der Erarbeitung dieser Dissertation.

Dipl. Chemikerin Dunja Reiß danke ich sehr herzlich für die umfassende und professionelle Einarbeitung, Dr. rer. nat. Marta Danecka für unzählige Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente und vor allem ihre Bereitschaft alle meine Fragen stets geduldig und zielführend zu beantworten. Ich danke Dipl. Ing. (FH) Mathias Woidy für die Hilfe bei der Erstellung der PAH *activity landscapes*. Danke an Heidi Puchta und Isabell Schönwasser und dem Laborteam für ihre vielseitige Unterstützung und in jeglicher Hinsicht.

Ich bedanke mich bei meiner Mutter und meinem Vater für ihre finanzielle, aber vor allem emotionale Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt, der es mir ermöglicht hat, meinen Weg zu finden und diese Arbeit zu vollenden.

Mein Dank gilt Stephanie für ihre Freundschaft, ohne die mein Leben ein anderes wäre und ihre Bereitschaft mich wieder und wieder zu bestärken. Ich danke Cosima, Clarissa und Sandra, den Gleichgesinnten, mit denen sich das Leid so gut teilen lässt und deren Unterstützung mit nichts aufzuwerten ist. Von ganzem Herzen danke ich Max, meinem Felsen, ohne den ich keine Brandung sein könnte.

Ich widme diese Arbeit meiner Schwester Juliane, weil es sich zu kämpfen lohnt. Ich danke ihr dafür, dass sie mir bei der Vollendung dieser Arbeit immer zur Seite gestanden hat, mir Kraft gegeben und Mut zugesprochen hat.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABU-OMAR, M. M., LOAIZA, A., HONTZEAS, N. 2005. Reaction Mechanisms of Mononuclear Non-Heme Iron Oxygenases. *Chemical Reviews*, 105(6), 2227-2252.
- AGUADO, C., PÉREZ, B., GARCÍA, M.J., BÉLANGER-QUINTANA, A., MARTÍNEZ-PARDO, M., UGARTE, M., DESVIAT, L.R. 2007. BH₄ responsiveness associated to a PKU mutation with decreased binding affinity for the cofactor. *Clinica Chimica Acta*, 380, 8-12.
- ANASTASOAE, V., KURZIUS, L., FORBES, P., WAISBREN, S. 2008. Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 95(1-2).
- ANDERSEN, O. A., FLATMARK, T., HOUGH, E. 2001. High Resolution Crystal Structures of the Catalytic Domain of Human Phenylalanine Hydroxylase in its Catalytically Active Fe(II) Form and Binary Complex with Tetrahydrobiopterin. *Journal of Molecular Biology*, 314(2), 279-291.
- ANFENSEN, C. B. 1973. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, 181(4096), 223-230.
- ANJEMA, K., VAN RIJN, M., HOFSTEDE, F.C., BOSCH, A.M., HOLLAK, C.E.M., RUBIO-GOZALBO, E., DE VRIES, M.C., JANSSEN, M.C.H., BOELEN, C.C.A., BURGERHOF, J.G.M., BLAU, N., HEINER-FOKKEMA, M.R., VAN SPRONSEN, F.J. 2013. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria: prediction with the 48-hour loading test and genotype. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8.
- BÉLANGER-QUINTANA, A., BURLINA, A., HARDING, C.O., MUNTAU, A.C. 2011. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, S19-S25.
- BERNEGGER, C. & BLAU, N. 2002. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. *Molecular Genetics and Metabolism*, 77, 304-313.
- BICKEL, H., GERRARD, J., HICKSMANS, E.M. 1953. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *The Lancet*, 265, 812-918.
- BJØRGO, E., KNAPPSKOG, P.M., MARTINEZ, A., STEVENS, R.C., FLATMARK, T. 1998. Partial characterization and three-dimensional-structural localization of eight mutations in exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene associated with phenylketonuria. *European Journal of Biochemistry*, 257, 1-10.
- BLAU, N. 2006. Differenzialdiagnose der Hyperphenylalaninämien Screening auf angeborene Stoffwechselkrankheiten. *Kinder- und Jugendmedizin*, 4, 225-232.
- BLAU, N. 2008. Defining tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsiveness in PKU. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31, 2-3.
- BLAU, N., BÉLANGER-QUINTANA, A., DEMIRKOL, M., FEILLET, F., GIOVANNINI, M., MACDONALD, A., TREFFZ, F. K., VAN SPRONSEN, F. J. 2009. Optimizing the use of sapropterin (BH₄) in the management of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 96, 158-163.
- BLAU, N., BÉLANGER-QUINTANA, A., DEMIRKOL, M., FEILLET, F., GIOVANNINI, M., MACDONALD, A., TREFFZ, F.K., VAN SPRONSEN, F., 2010a. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, 109-115.

- BLAU, N. & ERLANDSEN, H. 2004. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 82, 101-111.
- BLAU, N., HENNERMANN, J.B., LANGENBECK, U., LICHTER-KONECKI, U. 2011. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, S2-S9.
- BLAU, N. & LONGO, N. 2015. Alternative therapies to address the unmet medical needs of patients with phenylketonuria. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 16(6), 791-800.
- BLAU, N., VAN SPRONSEN, F. J., LEVY, H.L. 2010b. Phenylketonuria. *The Lancet*, 376, 1417-1427.
- BOSCH, A. M., BURLINA, A., CUNNINGHAM, A., BETTIOL, E., MOREAU-STUCKER, F., KOLEDOVA, E., BENMEDJAHED, K., REGNAULT, A. 2015. Assessment of the impact of phenylketonuria and its treatment on quality of life of patients and parents from seven European countries. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10:80.
- BRAUN-FALCO, O., PLEWIG, G., WOLFF, H.H., WINKELMANN, R.K. 1991. Skin Diseases Due to Disorders of Amino Acid Metabolism. *Dermatology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH.
- BRUMM, V. L., BILDER, D., WAISBREN, S.E. 2010. Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, S59-S63.
- BURLINA, A. & BLAU, N. 2009. Effect of BH₄ supplementation on phenylalanine tolerance. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32, 40-45.
- CAMP, K. M. & PARISI, M. A., ACOSTA, P. B., BERRY, G. T., BILDER, D. A., BLAU, N., BODAMER, O. A., BROSCO, J. P., BROWN, C. S., BURLINA, A. B., BURTON, B. K., CHANG, C. S., COATES, P. M., CUNNINGHAM, A. C., DOBROWOLSKI, S. F., FERGUSON, J. H., FRANKLIN, T. D., FRAZIER, D. M., GRANGE, D. K., GREENE, C. L., GROFT, S. C., HARDING, C. O., HOWELL, R. R., HUNTINGTON, K. L., HYATT-KNORR, H. D., JEVAJI, I. P., LEVY, H. L., LICHTER-KONECKI, U., LINDEGREN, M. L., LLOYD-PURYEAR, M. A., MATALON, K., MACDONALD, A., MCPHEETERS, M. L., MITCHELL, J. J., MOFIDI, S., MOSELEY, K. D., MUELLER, C. M., MULBERGAE, A. E., NERURKAR, L. S., OGATA, B. N., PARISER, A. R., PRASAD, S., PRIDJIAN, G., RASMUSSEN, S. A., REDDY, U. M., ROHR, F. J., SINGH, R. H., SIRRS, S. M., STREMER, S. E., TAGLE, D. A., THOMPSON, S. M., URVB, T. K., UTZ, J. R., VAN SPRONSEN, F., VOCKLEY, J., WAISBREN, S. E., WEGGLICKI, L. S., WHITE, D. A., WHITLEY, C. B., WILFOND, B. S., YANNICELLI, S., YOUNG, J. M. 2014. Phenylketonuria Scientific Review Conference: State of the science and future research needs. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112, 87-112.
- CAZZORLA, C., CEGOLON, L., BURLINA, A.P., CELATO, A., MASSA, P., GIORDANO, L., POLO, G., DANIELE, A., SALVATORE, F., BURLINA, A.B. 2014. Quality of Life (QoL) assessment in a cohort of patients with Phenylketonuria. *BMC Public Health*, 14:1243.
- CERRETO, M., CAVALIERE, P., CARLUCCIO, C., AMATO, F., ZAGARI, A., DANIELE, A., SALVATORE, F. 2011. Natural phenylalanine hydroxylase variants that confer a mild phenotype affect the enzyme's conformational stability and oligomerization equilibrium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812, 1435-1445.

- CHACE, D. H., MLLINGTON, D.S., TERADA, N., KAHIER, S.G., ROE, C.R., HOFMAN, L.F. 1993. Rapid Diagnosis of Phenylketonuria by Quantitative Analysis for Phenylalanine and Tyrosine in Neonatal Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 39, 66-71.
- CHRIST, S. E. 2003. Asbjørn Følling and the Discovery of Phenylketonuria. *Journal of the History of the Neurosciences*, 12, 44-54.
- CLEARLY, M., TREFZ, F., MUNTAU, A.C., FEILLET, F., VAN SPRONSEN, F.J., BURLINA, A., BÉLANGER-QUINTANA, A., GIZEWSKA, M., GASTEYGER, C., BETTIOL, E., BLAU, N., MACDONALD, A. 2013. Fluctuations in phenylalanine concentrations in phenylketonuria: A review of possible relationships with outcomes. *Molecular Genetics and Metabolism*.
- CORSELLIS, J. A. N. 1953. The pathological report of a case of phenylpyruvic oligophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 16, 139-143.
- DANECKA, M. K., WOJDY, M., ZSCHOCKE, J., FEILLET, F., MUNTAU, A.C., GERSTING, S.W. 2015. Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria. *Journal of Medical Genetics*, 52, 175-185.
- DE BAULNY, H. O., ABADIE, V., FEILLET, F., DE PARSCAU, L. 2007. Management of Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia. *The Journal of Nutrition*, 137, 15615-15635.
- DE GROOT, M. J., HOEKSMAN, M., BLAU, N., REIJNGOUD, D. J., VAN SPRONSEN, F. J. 2010. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: Review of hypotheses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, S86-S89.
- DING, Z., GEORGIEV, P., THÖNY, B. 2006. Administration-route and gender-independent longterm therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 13, 587-593.
- DING, Z., HARDING, C.O., REBUFFAT, A., ELZAOUK, L., WOLFF, J.A., THÖNY, B. 2008. Correction of Murine PKU Following AAV-mediated Intramuscular Expression of a Complete Phenylalanine Hydroxylating System. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(4), 673-681.
- DING, Z., HARDING, C.O., THÖNY, B. 2004. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81(1), 3-8.
- DOBROWOLSKI, S. F., PEY, A.L., KOCH, R. LEVY, H., ELLINGSON, C.C., NAYLOR, E.W., MARTINEZ, A. 2009. Biochemical characterization of mutant phenylalanine hydroxylase enzymes and correlation with clinical presentation in hyperphenylalaninaemic patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32, 10-21.
- DOENECKE, D., KOOLMAN, J., FUCHS, G., GEROK, W. 2005. Stoffwechsel der Proteine und Aminosäuren. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Thieme.
- DWORNICZAK, B., GRUDDA, K., STÜMPER, J., BATHOLOMÉ, K., AULEHLA-SCHOLZ, C., HORST, J. 1991. Phenylalanine Hydroxylase Gene: Novel Missense Mutation in Exon 7 Causing Severe Phenylketonuria . *Genomics*, 9, 193-199.
- EISENSMITH, R. C. & WOO, S. L. C. 1992. Molecular Basis of Phenylketonuria and Related Hyperphenylalaninurias : Mutations and Polymorphisms in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Human Mutation*, 1, 13-23.
- ERLANDSEN, H., FUSETTI, F., MARTINEZ, A., HOUGH, E., FLATMARK, T., STEVENS, R. C. 1997. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nature Structural Biology* 4, 995-1000.

- ERLANDSEN, H. & PEY, A. L., GÁMEZ, A., PÉREZ, B., DESVIAT, L.R., AGUADO C., KOCH, R., SURENDRAN S., TYRING, S., METALON, R., SCRIVER, C.R., UGARTE, M., MARTINEZ, A., STEVENS, R.C. 2004. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations PNAS. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101, 16903-16908.
- ERLANDSEN, H. & STEVENS, R. C. 1999. The Structural Basis of Phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68, 103-125.
- FEILLET, F., CLARKE, L., MELI, C., LIPSON, M., MORRIS, A.A., HARMATZ, P., MOULDI, D.R., GREEN, B., DORENBAUM, A., GIOVANNINI, M., FOEHR, E. 2008. Pharmacokinetics of Sapropterin in Patients with Phenylketonuria. *Clinical Pharmacokinetics*, 47, 817-825.
- FEILLET, F., VAN SPRONSEN, F.J., MACDONALD, A., TREFZ, F.K., DEMIRKOL, M., GIOVANNINI, M., BÉLANGER-QUINTANA, A., BLAU, N. 2010. Challenges and Pitfalls in the Management of Phenylketonuria. *Pediatrics*, 126, 333-341.
- FERNANDES, J., SAUDUBRAY, J.M., VAN DEN BERGHE, G., WALTER, J.H. 2006. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment, Fourth, Revised Edition*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- FIEGE, B. & BLAU, N. 2007. Assessment of Tetrahydrobiopterin (BH4) Responsiveness in Phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*, 150(6).
- FITZPATRICK, P. F. 2003. Mechanism of Aromatic Amino Acid Hydroxylation. *Biochemistry*, 42(48), 14083-14091.
- FITZPATRICK, P. F. 2012. Allosteric Regulation of Phenylalanine Hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 519(2), 194-201.
- FLATMARK, T. & STEVENS, R. C. 1999. Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chemical Reviews*, 99, 2137-2160.
- FLYDAL, M. I. & MARTINEZ, A. 2013. Phenylalanine Hydroxylase: Function, Structure, and Regulation. *IUMB Life*, 65(4), 341-349.
- FØLLING, A. 1934. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fuer Physiologische Chemie*, 227, 169-176.
- FUSETTI, F., ERLANDSEN, H., FLATMARK, T., STEVENS, R.C. 1998. Structure of Tetrameric Human Phenylalanine Hydroxylase and Its Implications for Phenylketonuria. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 16962-16967.
- GASSIÓ, R., CAMPISTOL, J., VILASECA, M.A., LAMBRUSCHINI, N., CAMBRA, F.J., FUSTE, E. 2003. Do adult patients with phenylketonuria improve their quality of life after introduction/resumption of a phenylalanine-restricted diet? *Acta Paediatrica*, 92, 1474-1478.
- GERSTING, S. W., KEMTER, K.F., STAUDIGL, M., MESSING D.D., DANECKA M.K., LAGLER, F.B., SOMMERHOFF C.P., ROSCHER, A.A., AND MUNTAU, A.C. 2008. Loss of Function in Phenylketonuria Is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability. *The American Journal of Human Genetics*, 83, 5-17.
- GERSTING, S. W., LAGLER, F.B., EICHINGER, A., KEMTER, K.F., DANECKA M.K., MESSING, D.D., STAUDIGL, M., DONDEY K.A., ZSIFKOVITS, C., FINGERHUT, R., GLOSSMANN, H., ROSCHER, A.A., MUNTAU A.C. 2010. Pah^{enu1} is a mouse model for tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency and promotes analysis of the pharmacological chaperone mechanism in vivo *Human Molecular Genetics*, 19, 2039-2049.
- GERSTING, S. W. & STAUDIGL, M., TRUGER, M.S., MESSING D.D., DANECKA M.K., SOMMERHOFF C.P., KEMTER, K.F., AND MUNTAU, A.C. 2010.

- Activation of Phenylalanine Hydroxylase Induces Positive Cooperativity toward the Natural Cofactor *Journal of biological chemistry*, 285, 30686-30697.
- GJETTING, T., PETERSEN, M., GULDBERG, P., GÜTTLER, F. 2001. *In vitro* Expression of 34 naturally occurring mutant variants of phenylalanine hydroxylase: correlation with metabolic phenotypes and susceptibility toward protein aggregation *Molecular Genetics and Metabolism*, 72, 132-143.
- GOLDBERG, A. L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426, 895-899.
- GROSELJ, U., TANSEK, M.Z., BATTELINO, T. 2014. Fifty years of phenylketonuria newborn screening — A great success for many, but what about the rest? *Molecular Genetics and Metabolism*, 113, 8-10.
- GULDBERG, P., REY, F., ZSCHOCKE, J., ROMANO, V., FRANCOIS, B., MICHIELS, L., ULLRICH, K., HOFFMANN, G. F., BURGARD, P., SCHMIDT, H., MELI, C., RIVA, E., DIANZANI, I., PONZONE, A., REY, J., GÜTTLER, F. 1998. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 63, 71-79.
- GUTHRIE, R. 1996. The introduction of newborn screening for phenylketonuria, A personal history. *European Journal of Pediatrics*, 155, S4-S5.
- GUTHRIE, R. & SUSI, A. 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32, 338-343.
- HANLEY, W. B. 2011. Non-PKU mild hyperphenylalaninemia (MHP)- The dilemma. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, 23-26.
- HARDING, C. O. & BLAU, N. 2010. Advances and challenges in phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(6), 645-648.
- HARDING, C. O. & GIBSON, K. M. 2010. Therapeutic liver repopulation for phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33, 681-687.
- HARTL, F. U., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.
- HASSEL, C. W., BRUNSTING, L.A. 1959. Phenylpyruvic Oligophrenia An Evaluation of the Light-Sensitive and Pigmentary Characteristics of Seventeen Patients *Archives of Dermatology*, 79(4), 458-465.
- HEINTZ, C., COTTON, R. G.H., BLAU, N. 2013. Tetrahydrobiopterin, its Mode of Action on Phenylalanine Hydroxylase, and Importance of Genotypes for Pharmacological Therapy of Phenylketonuria. *Human Mutation*, 34, 927-936.
- HENNERMANN, J. B., BÜHRER, C., BLAU, N., VETTER, B., MÖNCH, E. 2005. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86 Suppl 1, S86-S90.
- HOANG, L., BYCK, S., PREVOST, L., SCRIVER, C.R. 1996. PAH Mutation Analysis Consortium Database: a database for disease-producing and other allelic variation at the PAH locus. *Nucleic Acids Research* 24, 127-131.
- HOOD, A., GRANGE, D.K., CHRIST, S.E., STEINER, R., WHITE, D.A. 2014. Variability in Phenylalanine Control Predicts IQ and Executive Abilities in Children with Phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(4), 445-451.
- HUGHES, R. D., MITRY R.R., DHAWAN, A. 2012. Current Status of Hepatocyte Transplantation. *Transplantation*, 93(\$9, 342-347.
- JAFFE, E. K., STITH, L., LAWRENCE, S.H., ANDRAKE, M., DUNBRACK JR., R.L. 2013. A new model for allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase: Implications

- for disease and therapeutics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 530, 73-82.
- JENNINGS, I. G., TEH, T., KOBE, B. 2001. Essential role of the N-terminal autoregulatory sequence in the regulation of phenylalanine hydroxylase. *FEBS letters*, 488(3), 196-200.
- JERVIS, G. A. 1953. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 83, 514-515.
- KAUFMAN, S. 1958. A new Cofactor Required for the Enzymatic Conversion of Phenylalanine to Tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 230, 931-939.
- KAUFMAN, S. 1959. Studies on the Mechanism of the Enzymatic Conversion of Phenylalanin to Tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 2677-2682.
- KAUFMAN, S. 1963. The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. *Biochemistry*, 50, 1085-1092.
- KAUFMAN, S. & MASON, K. 1982. Specificity of amino acids as activators and substrates for phenylalanine hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(24), 14667-14678.
- KAYAALP, E., TREACY, E., WATERS, P. J., BYCK, S., NOWACKI, P., SCRIVER, C.R. 1997. Human Phenylalanine Hydroxylase Mutations and Hyperphenylalaninemia Phenotypes: A Metanalysis of Genotype-Phenotype Correlations. *American Journal of Human Genetics*, 61, 1309-1317.
- KEIL, S., ANJEMA, K., VAN SPRONSEN, F. J., LAMBRUSCHINI, N., BURLINA, A., BÉLANGER-QUINTANA, A., MARIA L. COUCE, M. L., FEILLET, F., CERONE, R., LOTZ-HAVLA, A. S., MUNTAU, A. C., BOSCH, A. M., MELI, C. A. P., BILLETTE DE VILLEMEUR, T., KERN, I., RIVA, E., GIOVANNINI, M., DAMAJ, L., LEUZZI, V., BLAU, N. 2013. Long-term Follow-up and Outcome of Phenylketonuria Patients on Sapropterin: A Retrospective Study. *Pediatrics*, 131, e1881-e1888.
- KIM, Y. E., HIPPEL, M.S., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M., HARTL, F.U. 2013. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 323-355.
- KLEIN J. 2011. Newborn screening from an international perspective- Different countries, different approaches. *Clinical Biochemistry*, 44, 471-472.
- KNAPPSKOG, P. M., FLATMARK, T., AARDEN, J.M., HAAVIK, J., MARTINEZ, A. 1996. Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. *European Journal of Biochemistry*, 242, 813-821.
- KOBE, B., JENNINGS, I.G., HOUSE, C.M., MICHEL, B.J., GOODWILL, K.E., SANTARSIERO, B.D., STEVENS, R.C., COTTON, R.G.H., KEMP, B.E. 1999. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Structural Biology*, 6, 442-448.
- KOCH, R., BURTON, B., HOGANSON, G., PETERSON, R., RHEAD, W., ROUSE, B., SCOTT, R., WOLFF, J., STERN, A.M., GUTTLER, F., NELSON, M., DE LA CRUZ, F., COLDWELL, J., ERBE, R., GERAGHTY, M.T., SHEAR, C., THOMAS, J., AZEN, C. 2002. Phenylketonuria in adulthood: A collaborative study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 25, 333-346.
- KURE, S., HOU, D., OHURA, T., IWAMOTO, H., SUZUKI, S., SUGIYAMA, N., SAKAMOTO, O., FUJII, K., MATSUBARA, Y., NARISAWA, K. 1999. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, 135, 375-378.
- LANG, F. 2009. *Encyclopedia of Molecular Mechanism of Disease: With 213 Tables*, Berlin Heidelberg Springer-Verlag GmbH.
- LEE, P., TREACY, E. P., CROMBEZ, E., WASSERSTEIN, M., WABER, L., WOLFF, J., WENDEL, U., DORENBAUM, A., BEBCHUK, J., CHRIST-SCHMIDT, H.,

- SEASHORE, M., GIOVANNINI, M., BURTON, B. K., MORRIS, A. A. 2008. Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *American Journal of Medical Genetics*, 146A, 2851-2859.
- LEUDERS, S. & WOLFGART, E., OTT, T., DU MOULIN, M., VAN TEEFFELEN-HEITHOFF, A., VOGELPOHL, L., OCH, U., MARQUARDT, T., WEGLAGE, J., FELDMANN, R., RUTSCH, F. 2013. Influence of PAH Genotype on Sapropterin Response in PKU: Results of a Single-Center Cohort Study. *JIMD Reports*, 13, 101-109.
- LEUZZI, V., CARDUCCI, C., CARDUCCI, C., CHIAROTTI, F., ARTIOLA, C., GIOVANNIELLO, T., ANTONOZZI, I. 2006. The spectrum of phenylalanine variations under tetrahydrobiopterin load in subjects affected by phenylalanine hydroxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, 38-46.
- LEVY, H. L., MILANOWSKI, A., CHAKRAPANI, A., CLEARY, M., LEE, P., TREFZ, F. K., WHITLEY, C.B., FEILLET, F., FEIGENBAUM, A. S., BEBCHUK, J. D., CHRIST-SCHMIDT, H., DORENBAUM, A. 2007. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *The Lancet*, 370, 504-510.
- LONGO, N., HARDING, C.O., BURTON, B.K., GRANGE, D.K., VOCKLEY, J., WASSERSTEIN, M., RICE, G.M., DORENBAUM, A., NEUENBURG, J.K., MUSSON, D.G., GU, Z., SILE, S. 2014. Phase 1 Trial of Subcutaneous rAvPAL-PEG in Subjects with Phenylketonuria. *The Lancet*, 384(9937), 37-44.
- MARTINEZ, A., KNAPPSKOG P.M., OLAFSDOTTIR, S., DOESKELAND, A.P., EIKEN, H.G., SVEBAK, R.M., BOZZINI, M.L., APOLD, J., FLATMARK, T. 1995. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. *Biochemical Journal*, 306, 589-597.
- MARTYNYUK, A. E., VAN SPRONSEN, F.J., VAN DER ZEE, E.A. 2010. Animal models of brain dysfunction in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, S100-S105.
- MATALON, R., MICHALS-MATALON, K., BHATIA, G., BURLINA, A.B., BURLINA, A.P., BRAGA, C., FIORI, L., GIOVANNINI, M., GRECHANINA, E., NOVIKOV, P., GRADY, J., TYRING, S.K., GUTTLER, F. 2007. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: Effect on blood phenylalanine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30, 153-158.
- MATTOO, R. U., GOLOUBINOFF, P. 2014. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 71(17), 3311-3325.
- MAZARIEGOS, G., SHNEIDER, B., BURTON, B., FOX, I.J., HADZIC, N., KISHNANI, P., MORTON, D.H., MCINTIRE, S., SOKOL, R.J., SUMMAR, M., WHITE, D., CHAVANON, V., VOCKLEY, J. 2014. Liver transplantation for pediatric metabolic disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111, 418-427.
- MCDONALD J. D., B., V. C. 1988. Hyperphenylalaninemia in the *hph-1* Mouse Mutant. *Pediatric Research*, 23, 63-67.
- MCDONALD, J. D., BODE, V.C., DOVE, W.F., SHEDLOVSKY, A. 1990. *Pah^{hph-5}*: A mouse mutant deficient in phenylalanine hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1965-1967.
- MERCK 2014. Merck gibt positives Ergebnis der Phase-IIIb-Studie zu Kuvan bekannt. www.merck.de.

- MERCK 2015. Merck erhält EU-Zulassung für Anwendungserweiterung von Kuvan auf Kinder unter 4 Jahren mit PKU.
- MIRANDA, F. F., TEIGEN, K., THÓRÓLFSSON, M., SVEBAK, R.M., KNAPPSKOG, P.M., FLATMARK, T., MARTÍNEZ, A. 2002. Phosphorylation and mutations of Ser(16) in human phenylalanine hydroxylase. Kinetic and structural effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 40937-40943.
- MITCHELL, J. J., TRAKADIS, Y.J., SCRIVER, C.R. 2011. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genetics in Medicine*, 13, 697-707.
- MOYLE, J. J., FOX, A.M., ARTHUR, M., BYNEVELT, M., BURNETT, J.R. 2007. Meta-Analysis of Neuropsychological Symptoms of Adolescents and Adults with PKU. *Neuropsychology Review*, 17, 91-101.
- MUNTAU, A. C. 2009. *Intensivkurs Pädiatrie*, München, Elsevier GmbH, Urban & Fisher Verlag.
- MUNTAU, A. C., BEBLO, S., KOLETZKO, B. 2000. Phenylketonurie und Hyperphenylanämie. *Monatsschr Kinderheilkd*, 148, 179-193.
- MUNTAU, A. C., BURLINA, A., EYSKENS, F., FREISINGER, P., DE LAET, C., LEUZZI, V., RUTSCH, F., SIVRI, H.S., VIJAY, S., BAL, M.O., GRAMER, G., PAZDÍRKOVÁ, R., CLEARY, M., LOTZ-HAVLA, A.S., MUNAFO, A., MOULD, D.R., MOREAU-STUCKER, F., ROGOFF, D. 2017. Efficacy, safety and population pharmacokinetics of sapropterin in PKU patients <4 years: results from the SPARK open-label, multicentre, randomized phase IIIb trial. *Orphanet J Rare Dis.*, 12, 47.
- MUNTAU, A. C. & GERSTING, S. W. 2010. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with in born errors of metabolism *Journal of Inherited Metabolic Disease*.
- MUNTAU, A. C., LEANDRO, J., STAUDIGL, M., MAYER, F., GERSTING, S.W. 2014. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37, 505-523.
- MUNTAU, A. C., RÖSCHINGER, W., HABICH, M., DEMMELMAIR, H., HOFFMANN, B., SOMMERHOFF, C.P., AND ROSCHER, A.A. 2002. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *The New England Journal of Medicine*, 347, 2122-2132.
- MURPHY, G. H., JOHNSON, S.M., AMOS, A., WEETCH, E., HOSKIN, R., FITZGERALD, B., LILBURN, M., ROBERTSON, L., LEE, P. 2008. Adults with untreated phenylketonuria: out of sight, out of mind. *The British Journal of Psychiatry*, 193, 501-502.
- NENNSTIEL-RATZEL, U., GENZEL-BOROVICZÉNY, O., BÖHLES, H., FUSCH, C., GRÜTERS-KIESLICH, A., MOHNIKE, K., ROSSI, R., ENSENAUER, R., ODENWALD, B., HOFFMANN, G. 2011. Leitlinie: Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien. *AWMF-Register Nr. 024/012 Klasse: S2k*. AWMF online
- NEY, D. M., GLEASON, ST., VAN CALCAR, S.C., MACLEOD, E.L., NELSON, K.L., ETZEL, M.R., RICE, G.M., WOLFF, J.A. 2009. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32, 32-39.
- OKANO, Y., WANG, T., EISENSMITH, R.C., LONGHI, R., RIVA, E., GIOVANNINI, M., CERONE, R., ROMANO, C., WOO, S.L. 1991. Phenylketonuria Missense Mutations in the Mediterranean. *Genomics*, 9, 96-103.
- OKANO, Y., WANG, T., EISENSMITH, R.C., STEINMANN, B., GITZELMANN, R., WOO, S.L. 1990. Missense mutations associated with RFLP haplotypes 1 and

- 4 of the human phenylalanine hydroxylase gene. *American Journal of Human Genetics*, 46(1), 18-25.
- OPLADEN, T. & BLAU, N. 2014. Tetrahydrobiopterin-(BH₄-) Mangelkrankheiten. In: VOM DAHL, S. E. A. (ed.) *Angeborene Stoffwechselkrankheiten bei Erwachsenen*. Berlin Heidelberg: Springer Medizin.
- PARDRIGDE, W. M. 1998. Blood-Brain Barrier Carrier-Mediated Transport and Brain Metabolism of Amino Acids. *Neurochemical Research*, 23, 635-644.
- PENROSE, L., QUASTEL, J.H. 1937. Metabolic Studies in Phenylketonuria. *Biochemical Journal* 31, 266-274.
- PENROSE, L. S. 1935. Inheritance of Phenylpyruvic Amentia (Phenylketonuria). *The Lancet*, 2, 192-194.
- PEY, A. L., DESVIAT, L.R., GÁMEZ, A., UGARTE, M., PÉREZ, B. 2003. Phenylketonuria: Genotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH *Human Mutation*, 21, 370-378.
- PEY, A. L. & MARTINEZ, A. 2005. The activity of wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: An isothermal titration calorimetry study. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, 43-53.
- PEY, A. L., STRICHER, F., SERRANO, L., MARTINEZ, A. 2007. Predicted Effects of Missense Mutations on Native-State Stability Account for Phenotypic Outcome in Phenylketonuria, a Paradigm of Misfolding Diseases. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 1006-1024.
- QUIRK, M. E., DOBROWOLSKI, S.F., NELSON, B.E., COFFEE, B., SINGH, R.H. 2012. Utility of phenylalanine hydroxylase genotype for tetrahydrobiopterin responsiveness classification in patients with phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 107(1-2), 31-36.
- SAHNI, N., YI, S., ZHONG, QUAN, Z., JAILKHANI, N., CHARLOTEAUX, B., CUSICK, M. E., VIDAL, M. 2013. Edgotype: a fundamental link between genotype and phenotype. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23, 649-657.
- SANTOS-SIERRA, S., KIRCHMAIR, J., PERNA, A.M., REIS, D., KEMTER, K., RÖSCHINGER W., GLOSSMANN, H., GERSTING, S.W., MUNTAU, A.C., WOLBER, G., LAGLER, F.B. 2012. Novel pharmacological chaperones that correct phenylketonuria in mice. *Human Molecular Genetics*, 21, 1877-1887.
- SCHAAF, C. P. & ZSCHOKE, J. 2013. *Basiswissen Humangenetik*, Berlin Heidelberg, Springer Medizin.
- SCRIVER, C. R. 1995. Whatever Happened to PKU? *Clinical Biochemistry*, 28, 137-144.
- SCRIVER, C. R. 2007. The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. *Human Mutation*, 28, 831-845.
- SCRIVER, C. R., HURTUBISE, M., KONECKI, D., PHOMMARINH, M., PREVOST, L., ERLANDSEN, H., STEVENS, R., WATERS, P. J., RYAN, S., MCDONALD, D., SARKISSIAN, C. 2003. PAHdb 2003: What a Locus-Specific Knowledgebase Can Do. *Human Mutation*, 21, 333-344.
- SCRIVER, C. R., KAUFMAN, S., WOO, S.L.C. 1988. Mendelian Hyperphenylalaninemia. *Annual Review of Genetics*, 22, 301-321.
- SCRIVER, C. R. & WATERS, P. J. 1999. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends in Genetics*, 15, 267-272.
- SHARMAN, R., SULLIVAN, K.A., YOUNG, R., MCGILL, J.J. 2010. Tyrosine monitoring in children with early and continuously treated phenylketonuria: results of an international practice survey. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33, S417-S420.

- SHEDLOVSKY, A., MCDONALD, J.D., SYMULA, D., DOVE, W.F. 1993. Mouse Models of Human Phenylketonuria *Genetics*, 134(4), 1205-1210.
- SHIMAN, R. 1980. Relationship between the Substrate Activation Site and Catalytic Site of Phenylalanine Hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(21), 10029-10032.
- SHIMAN, R., XIA, T., HILL, M.A., GRAY, D.W. 1994. Regulation of Rat Liver Phenylalanine Hydroxylase *The Journal of Biological Chemistry*, 269(40), 24647-24656.
- SOMARAJU, U. R. & MERRIN, M. 2015. Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3.
- STAUDIGL, M. & GERSTING, S. W., DANECKA M.K., MESSING D.D., WOJDY M., PINKAS D., KEMTER, K.F., BLAU N. AND MUNTAU, A.C. 2011. The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response *Human Molecular Genetics*, 20, 2628-2641.
- STÉPHENNE, X., DEBRAY, F.G., SMETS, F., JAZOULI, N., SANA, G., TONDREAU, T., MENTEN, R., GOFFETTE, P., BOEMER, F.,SCHOOS, R., GERSTING, S.W., NAJIMI, M., MUNTAU, A.C., GOYENS, P., SOKAL, E.M. 2012. Hepatocyte Transplantation Using the Domino Concept in a Child With Tetrabiopterin Nonresponsive Phenylketonuria. *Cell Transplantation*, 21, 2765-2770.
- STRISCIUGLIO, P. & CONCOLINO, D. 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU) *Metabolites*, 4, 1007-1017.
- TEIGEN, K. & MARTINEZ, A. 2003. Probing cofactor specificity in phenylalanine hydroxylase by molecular dynamics simulations. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 20(6), 773-740.
- THOMPSON, A. J., SMITH, I., BRENTON, D., YOUL, B.D., RYLANCE, G., DAVIDSON, D.C., KENDALL, B., LEES, A.J. 1990. Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *The Lancet*, 336, 602-605.
- THÖNY, B., DING, Z., REBUFFAT, A., VIECELLI, H.M. 2014. Phenotypic Reversion of Fair Hair upon Gene Therapy of the Phenylketonuria Mice. *Human Gene Therapy*, 25(7), 573-574.
- TREFZ, F. K., BURTON, B. K., LONGO, N., CASANOVA, M. M., GRUSKIN, D. J., DORENBAUM, A., KAKKIS, E. D., CROMBEZ, E. A., GRANGE, D. K., HARMATZ, P., LIPSON, M. H., MILANOWSKI, A., RANDOLPH, L. M., VOCKLEY, J., WHITLEY, C. B., WOLFF, J. A., BEBCHUCK, J., CHRIST-SCHMIDT, H., HENNERMANN, J. B. 2009. Efficacy of Sapropterin Dihydrochloride in Increasing Phenylalanine Tolerance in Children with Phenylketonuria: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *The Journal of Pediatrics*, 154, 700-707.e1.
- TREFZ, F. K., VAN SPRONSEN, F.J., MACDONALD, A., FEILLET, F., MUNTAU, A.C., BELANGER-QUINTANA, A.,BURLINA, A., DEMIRKOL, M., GIOVANNINI, M., GASTEYGER, C. 2015. Management of adult patients with phenylketonuria: survey results from 24 countries. *European Journal of Pediatrics*, 174, 119-127.
- UNDERHAUG, J., AUBI, O., AND MARTINEZ, A. 2012. Phenylalanine Hydroxylase Misfolding and Pharmacological Chaperones. *Current topics in Medicinal Chemistry*, 12, 2534-2545.
- VAN SPRONSEN, F. J. 2011a. Mild hyperphenylalaninemia: to treat or not to treat. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34, 651-656.
- VAN SPRONSEN, F. J., ENNS, G.M. 2010. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, S90-S95.

- VAN SPRONSEN, F. J., HUIJBREGTS, S.C.J., BOSCH, A.M., LEUZZI, V. 2011b. Cognitive, neurophysiological, neurological and psychosocial outcomes in early-treated PKU-patients: A start toward standardized outcome measurement across development. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, S45-S51.
- VAN SPRONSEN, F. J., VAN WEGBERG, A.M., AHRING, K., BÉLANGER-QUINTANA, A., BLAU, N., BOSCH, A.M., BURLINA, A., CAMPISTOL, J., FEILLET, F., GIŻEWSKA, M., HUIJBREGTS, S.C., KEARNEY, S., LEUZZI, V., MAILLOT, F., MUNTAU, A.C., TREFZ, F.K., VAN RIJN, M., WALTER, J.H., MACDONALD, A. 2017. Key European Guidelines for the Diagnosis and Management of Patients With Phenylketonuria *Lancet Diabetes Endocrinol.*
- VOCKLEY, J., ANDERSSON, H.C., ANTSEL, K.M., BRAVERMAN, N.E., BURTON, B.K., FRAZIER, D.M., MITCHELL, J., SMITH, W.E., THOMPSON, B.H., BERRY, S.A. 2014. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*, 16(2), 188-200.
- WAISBREN, S. E., NOEL, K., FAHRBACH, K., CELLA, C., FRAME, D., DORENBAUM, A., LEVY, H. 2007. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: A systematic literature review and meta-analysis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92, 63-70.
- WALTER, J. H. & WHITE, F. J. 2004. Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria. *International journal of adolescent medicine and health*, 16, 41-45.
- WATERS, P. J. 2003. How PAH Gene Mutations Cause Hyper-phenylalaninemia and Why Mechanism Matters: Insights From In Vitro Expression. *Human Mutation*, 21, 357-369.
- WATERS, P. J., PARNIAK, M.A., AKERMAN, B.R., SCRIVER, C.R. 2000. Characterization of Phenylketonuria Missense Substitutions, Distant from the Phenylalanine Hydroxylase Active Site, Illustrates a Paradigm for Mechanism and Potential Modulation of Phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism*, 69, 101-110.
- WATERS, P. J., PARNIAK, M.A., NOWACKI, P., SCRIVER, C.R. 1998. In Vitro Expression Analysis of Mutations in Phenylalanine Hydroxylase: Linking Genotype to Phenotype and Structure to Function. *Human Mutation*, 11, 4-17.
- WELCH, W. J. 2004. Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15, 31-38.
- WILLIAMS, R. A., MAMOTTE, C.D.S., BURNETT, J.R. 2008. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *The Clinical Biochemist Reviews*, 29, 31-41.
- WOO, S. L. C., LIDSKY, A.S., GÜTTLER, F., CHANDRA, T., ROBSON, K.J.H. 1983. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*, 306, 151-155.
- WWW.BIOPKU.ORG, B., N., YUE, W., PEREZ, B. www.biopku.org/pah www.biopku.org/biopku [Online].
- WWW.HGMD.CF.AC.UK, C., D.N., BALL, E.V., STENSON, P.D., PHILLIPS, A.D., EVANS, K., HEYWOOD, S., HAYDEN, M.J., MORT, M.E., HUSSAIN, M. The Human Gene Mutation Database.
- WWW.PAHDB.MCGILL.CA, S., C.R., PREVOST, L., HURTUBISE, M., KONECKI, D., DOBROWLSKI, S.F. www.pahdb.mcgill.ca [Online].
- YANO, S., MOSELEY, K., AZEN, C. 2013. Large Neutral Amino Acid Supplementation Increases Melatonin Synthesis in Phenylketonuria: A New Biomarker. *The Journal of Pediatrics*, 162, 999-1003.
- ZIMMERMANN, M., JACOBS, P., FINGERHUT, R., TORRESANI, T., THÖNY, B., BLAU, N., BAUMGARTNER, M.R., ROHRBACH, M. 2012. Positive effect of a

- simplified diet on blood phenylalanine control in different phenylketonuria variants, characterized by newborn BH4 loading test and PAH analysis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(3), 264-268.
- ZSCHOCKE, J. 2003. Phenylketonuria Mutations in Europe. *Human Mutation*, 21, 345-356.
- ZURFLÜH, M. R., GIOVANNINI, M., FIORI, L., FIEGE, B., GOKDEMIR, Y., BAYKAL, T., KIERAT, L., GÄRTNER, K.H., THÖNY, B., BLAU, N. 2005. Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on Filter paper. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, S96-103.
- ZURFLÜH, M. R., ZSCHOCKE, J., LINDNER, M., FEILLET, F., CHERY, C., BURLINA, A., STEVENS, R.C., THÖNY, B., BLAU, N. 2008. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Human Mutation*, 29, 167-175.